

**PENGARUH KONSENTRASI KRIOPROTEKTAN ETILEN
GLIKOL TERHADAP TINGKAT MATURASI DAN
FERTILISASI OOSIT SAPI BALI**

SKRIPSI

DEWI SARTIKA
1111 13 338



**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2017**

**Pengaruh Konsentrasi Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap
Tingkat Maturasi dan Fertilisasi Oosit Sapi Bali**

oleh :

DEWI SARTIKA
I111 13 338

**Disusun Untuk Memenuhi Syarat Kelulusan pada Fakultas Peternakan
Universitas Hasanuddin, Makassar**

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2017**

PERNYATAAN KEASLIAN

1. Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dewi Sartika

NIM : I 111 13 338

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa :

- a. Karya makalah hasil penelitian yang penulis tulis adalah asli
 - b. Apabila sebagian atau seluruhnya dari karya makalah hasil penelitian ini, terutama dalam Bab Hasil dan Pembahasan tidak asli atau plagiasi maka bersedia dibatalkan atau dikenakan sanksi akademik yang berlaku.
2. Demikian pernyataan keaslian ini dibuat untuk dapat dipergunakan sepenuhnya.

Makassar, Agustus 2017



Dewi Sartika

HALAMAN PENGESAHAN

Judul penelitian : Pengaruh Konsentrasi Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Tingkat Maturasi dan Fertilisasi Oosit Sapi Bali

Nama : Dewi Sartika

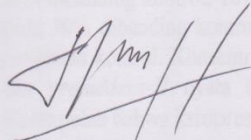
No. Pokok : I111 13 338

Fakultas : Peternakan

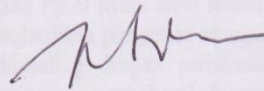
Skripsi ini telah diperiksa dan telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota



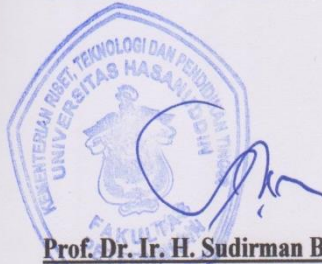
Prof. Dr. Ir. H. Herry Sonjaya, DEA,DES
NIP. 19570129 198003 1 001



Prof. Dr. Ir. H. Abd. Latief Toleng, M.Sc
NIP. 19540602 197802 1 001

Diketahui Oleh :
Dekan Fakultas Peternakan

Ketua program studi peternakan



Prof. Dr. Ir. H. Sudirman Baco, M.Sc
NIP. 19641231 198903 1 025



Prof. Dr. drh. Hj. Ratmawati Malaka, M.Sc
NIP. 19640712 198911 2 002

Tanggal Lulus: 09 oktober 2017

ABSTRAK

Dewi Sartika (I111 13 338), Pengaruh Konsentrasi Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Tingkat Maturasi dan Fertilisasi Oosit Sapi Bali. Di bawah bimbingan **Herry Sonjaya**, sebagai pembimbing utama dan **Abd. Latief Toleng** sebagai pembimbing anggota.

Pembekuan oosit akan menyebabkan cekaman dingin dan pembentukan kristal es yang akan merusak struktur sel oosit, dan untuk mengurangi kerusakan tersebut diperlukan etilen glikol sebagai krioprotektan pada saat pembekuan. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh konsentrasi krioprotektan etilen glikol terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi oosit sapi Bali. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan etilen glikol, yaitu 0 %, 10 %, 20 % dan 30% dan 4 ulangan. Oosit kualitas A dikriopreservasi selama 24 Jam lalu dimaturasi 24 jam dan difertilisasi 16 jam di dalam inkubator. Parameter yang diamati tahap tingkat maturasi: *germinal vesicle*, *germinal vesicle break down*, *metaphase-I* dan *metaphase-II*, dan tingkat fertilisasi: 0 pronukleus, 1 pronukleus, dan 2 pronukleus. Hasil penelitian menunjukkan tahap pematangan GV dan M-I nyata lebih rendah pada perlakuan 30% dibanding kontrol, 10% dan 20%. Fertilisasi tahap PN-0 sangat nyata lebih rendah pada 30% dibanding kontrol, 10% dan 20% sedangkan PN-II nyata lebih rendah pada perlakuan kontrol. Konsentrasi etilen glikol 30% menghasilkan presentase *mataphase-II* dan *pronukleus-II* nyata ($P<0,05$) lebih tinggi dibanding dengan perlakuan lain. Kesimpulan bahwa kriopreservasi oosit sapi Bali dengan penambahan krioprotektan etilen glikol dapat mengurangi penurunan persentase oosit yang matang (M-II) dan tingkat fertilisasi oosit dengan penggunaan konsentrasi terbaik yaitu 30% etilen glikol.

Kata Kunci : Oosit sapi Bali, kriopreservasi, etilen glikol, tingkat maturasi dan fertilisasi.

ABSTRACT

Dewi Sartika (I111 13 338), Effect of Ethylene Glycol Cryoprotectant Concentration on Maturation Rate and Fertilization of Bali Cow's Oocyte. Under the guidance of **Herry Sonjaya**, as main supervisor and **Abd. Latief Toleng**, as the supervisor

Freezing the oocyte will cause cold stress and ice crystal formation which will damage the cell structure of the oocyte, and to reduce the damage is required ethylene glycol as cryoprotectant at the time of freezing. This study aims to determine the effect of ethylene glycol cryoprotectant concentration on the rate of maturation and fertilization of Bali beef oocytes. This study used Completely Randomized Design (RAL) with four ethylene glycol treatments, ie 0%, 10%, 20% and 30% and 4 replications. A quality oocyte was frozen over 24 hours and then matured over 24-hour and 16-hour fertilized in the incubator. Parameters observed at the maturation stage: germinal vesicle, germinal vesicle break down, metaphase-I and metaphase-II, and fertilization rates: 0 pronucleus, 1 pronucleus, and 2 pronucleus. The results showed that the maturation stage of GV and M-I was significantly lower at 30% treatment compared to control, 10% and 20%. Fertilization of PN-0 stage was significantly lower at 30% compared to control, 10% and 20% while PN-II was significantly lower in control treatment. A 30% concentration of ethylene glycol yielded a significantly higher percentage of metaphase-II and pronucleus II ($P < 0.05$) than with other treatments. The conclusion that cryopreservation of Bali cow oocytes with the addition of ethylene glycol cryoprotectants may reduce the decrease in mature oocyte percentage (M-II) and fertilization rate of oocytes by using the best concentration of 30% ethylene glycol.

Keywords : Bali Cows oocytes, cryopreservation, ethylene glycol, maturation and fertilization rates.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan makalah hasil penelitian yang berjudul **Pengaruh Konsentrasi Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Tingkat Maturasi dan Fertilisasi Oosit Sapi Bali**. Makalah ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar. Pada kesempatan ini, dengan penuh rasa hormat penulis ingin menghaturkan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. **Keluarga besar** penulis, terutama kedua orang tua, **Dacing dan Mince** , nenek kakak **Mirdawati, Rosmidar, Misran**, adik **Witra Aprianti, M. Yusran, dan Mikayla Qalista** serta kedua ponakan yaitu **Aqila Apra Salsabila dan Muh. Algafari Ramadhan** Terima kasih atas segala dukungan moril, materil dan doa sehingga melancarkan segala urusan penulis dalam kebaikan.
2. **Prof. Dr. Ir. H. Herry Sonjaya, DEA. DES** selaku pembimbing utama sekaligus dosen yang selalu memberikan dukungan moril dan motivasi kepada penulis layaknya bapak sendiri Kemudian **Prof. Dr. Ir. H. Abd. Latief Toleng, M.Sc** selaku pembimbing kedua yang telah banyak pula **membagi ilmunya kepada saya**. Penulis berterima kasih atas segala bantuan, nasehat, dukungan dan bimbingan sejak awal hingga akhir studi penulis.
3. Bapak **Dr. Hasbi, S.Pt, M.Si** yang telah mengajarkan teknik mencacah ovarium hingga proses pengamatan inti dan membantu kami selama penelitian ini.

4. **Dr. Ir. Jamila., M. Sc** selaku penasehat akademik penulis yang telah memberikan bimbingan selama masa perkuliahan penulis.
5. Semua dosen-dosen dan pegawai di Universitas Hasanuddin, khususnya Fakultas Peternakan. Terkhusus kepada **kak Icha** dan **Pak Nasir** yang selalu melayani kebutuhan administrasi penulis dengan sangat ramah.
6. Pihak beasiswa **Bidik Misi** yang telah memberikan bantuan materil sejak semester awal hingga penulis menyelesaikan studi di Universitas Hasanuddin.
7. **Bapak Ridwan** dari pihak RPH Tamangapa Makassar yang telah membantu kami mendapatkan bahan utama penelitian yaitu ovarium sapi bali.
8. Sahabat dan sekaligus saudara tak sedarah **ismi halik** yang telah banyak memberikan motivasi, dukungan materi maupun moril dan **Abd. Azis Malik.,** yang selalu mendampingi penulis dalam suka maupun duka. Pemberi masukan terbanyak, motivasi, dukungan, doa, materil, pelajaran dan semangat bagi penulis.
9. Rekan-rekan sepenelitian yaitu **Nasrullah, Nawawi Arfan, Hikmayani Iskandar, andi nurul airin, Asri Puspita** dan **Hilma Utami Putri** yang telah mencurahkan segenap tenaga, waktu, materi dan perhatiannya selama penelitian ini. Terutama kepada Nasrullah dan Nawawi yang bersedia untuk mengambil ovarium dari RPH.
10. Sahabat-sahabat terbaik penulis selama di Fakultas Peternakan, terutam, **farna wijaya alfarianty, Bernice paseru, midiawati sukma, zhazadilla, M. Akbar, Asri puspita** dan teman paling setia **andi nurmillatul haqiqiyah** meskipun saat ini sudah berbeda kampus.

11. Teman-teman dari SMA 1 anggeraja **Excact One** tahun 2013 sama-sama berjuang masuk perguruan tinggi meskipun harus berbeda kampus tapi tetap sehati katanya.
12. Himpunan tercinta **HIMAPROTEK-UH** yang menjadi wadah untuk melakukan praktek atas ilmu dan teori yang telah diperoleh di bangku perkuliahan.
13. Teman-teman seperjuangan **Larfa 2013**, khususnya **kelas C** yang telah menemani melalui perjuangan kuliah, laboratorium, asistensi yang kadang pergi subuh pulang malam tapi insya Allah ada hasilnya.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan pada makalah seminar hasil ini, untuk itu penulis senantiasa membuka diri terhadap saran, masukan dan kritik yang sifatnya membangun demi meningkatkan kemampuan dan pengetahuan penulis dalam menyusun makalah serupa dikemudian hari.

Akhirnya, penulis berharap semoga makalah hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang membacanya demi mengembangkan ilmu pengetahuan, terutama bagi diri penulis sendiri. Semoga rahmat dan hidayat-Nya senantiasa bersama di segala aktifitas keseharian kita, Amin.

Makassar, Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
PERNYATAAN KEASLIAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
PENDAHULUAN	
Latar Belakang	1
Rumusan Masalah	3
Tujuan dan Kegunaan	3
TINJAUAN PUSTAKA	
Aktivitas ovarium	4
Folikulogenesis	5
Oogenesis	7
Maturasi <i>in vitro</i>	10
Fertilisasi <i>in vitro</i>	12
Kriopreservasi dan krioprotektan	14
Etilen glikol	17
Hipotesis	19
METODE PENELITIAN	
Waktu dan Tempat Penelitian	20
Materi Penelitian	20
Metode Penelitian	20
Parameter	24
Analisis Data	25
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Pengaruh kriopreservasi menggunakan etilen glikol terhadap tingkat maturasi oosit sapi Bali secara <i>in vitro</i>	28
Pengaruh kriopreservasi menggunakan etilen glikol terhadap tingkat fertilisasi oosit sapi Bali secara <i>in vitro</i>	32
PENUTUP	
Kesimpulan	36
	10

Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	
RIWAYAT HIDUP	
DOKUMENTASI	

DAFTAR TABEL

No.	<i>Teks</i>	Halaman
1.	Hasil persentase oosit sapi Bali tingkat maturasi yang dikriopreservasi menggunakan etilen glikol.....	29
2.	Hasil persentase oosit sapi Bali tingkat fertilisasi yang dikriopreservasi menggunakan etilen glikol.....	33

DAFTAR GAMBAR

No.	<i>Teks</i>	Halaman
1.	Gambar proses folikulogenesis	6
2.	Gambar proses oogenesis	8
3.	Gambar proses pembelahan meiosis pada oosit	9
4.	Diagram alir prosedur penelitian	19
5.	Gambar oosit <i>grade</i> A yang terpilih	22
6.	Gambar oosit setelah dikriopreservasi	23
7.	Gambar oosit setelah maturasi	23
8.	Gambar oosit setelah fertilisasi	24
9.	Gambar oosit setelah denodase	25
10.	Gambar status inti oosit setelah pematangan	28
11.	Gambar pembentukan pronukleus setelah fertilisasi	32

DAFTAR LAMPIRAN

No	Teks
1.	Komposisi media maturasi secara <i>in vitro</i>
2.	Komposisi media fertilisasi secara <i>in vitro</i>
3.	Jumlah oosit dari beberapa kualitas yang berbeda
4.	Pengaruh kualitas oosit terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi Secara <i>in vitro</i>
5.	Pengaruh kualitas oosit terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi Secara <i>in vitro</i> (%)
6.	Pengaruh kualitas oosit terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi Secara <i>in vitro</i> (transformasi)
7.	Pengaruh kualitas oosit terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi Secara <i>in vitro</i> (standar deviasi)
8.	<i>Analysis of variance</i> (ANOVA) pada tingkat maturasi oosit
9.	<i>Analysis of variance</i> (ANOVA) pada tingkat fertilisasi <i>in vitro</i>

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Peternakan sapi potong di Indonesia terus berkembang seiring peningkatan pengetahuan di bidang peternakan. Permintaan daging pun meningkat seiring dengan peningkatan jumlah penduduk. Ternak sapi potong dalam negeri hanya mampu memenuhi kebutuhan daging 70-75% sehingga 25-30% harus diimpor dari luar negeri. Salah satu permasalahan yang dihadapi dalam rendahnya peningkatan sapi potong produksi dalam negeri yaitu tingginya pemotongan betina produktif.

Pemotongan betina produktif dalam negeri sudah tidak dapat dihindarkan lagi, di salah satu RPH resmi dijumpai bahwa 95 persen sapi yang dipotong setiap harinya adalah betina, betina muda, dan di antaranya adalah sapi betina bunting. Secara nasional, diperkirakan sekitar 150-200 ribu ekor sapi betina produktif dipotong setiap tahunnya. Jumlah ini sangat besar dan patut diduga akan mengganggu populasi dan produksi daging yang berasal dari sapi lokal (Sinartani, 2011) salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut yaitu dengan memanfaatkan teknologi fertilisasi secara in vitro (FIV).

Teknologi fertilisasi secara in vitro (FIV) pada ternak, khususnya sapi merupakan salah satu usaha memanfaatkan limbah ovarium dari induk sapi betina yang dipotong di Rumah Potong Hewan. Limbah ovarium dari hasil pemotongan betina produktif berlimpah dan akan terbuang sia-sia. Jika tidak segera tangani setelah kematian hewan maka ovarium akan kehilangan suplai oksigen dan energi akibat dari terputusnya aliran darah dan akan menempatkan ovarium pada kondisi ischemia (Lopes *et al.*, 2009). Selain itu juga dapat terjadi depolarisasi yang memicu gangguan pada keseimbangan ion yang pada akhirnya menyebabkan

kematian sel (Taylor, 2006) maka dari itu diperlukan penanganan dan penyimpanan oosit secara cepat salah satunya yaitu melalui metode kriopreservasi.

Kriopreservasi adalah teknik penyimpanan plasma nutfah pada suhu yang sangat rendah (- 196 oC) dalam jangka waktu yang lama. Pada proses pembekuan masalah yang sering timbul adalah pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) terhadap sel yang dibekukan dan perubahan kondisi intraseluler akibat pengeluaran air yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es (Herdis *et al.*, 2005). Kristal es yang terbentuk akan merusak struktur terutama membran plasma dan mitokondria (Lemma, 2011). Untuk mencegah terbentuknya kristal es selama proses pembekuan dapat dilakukan penambahan zat pelindung atau krioprotektan. Krioprotektan adalah zat kimia nonelektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan. Jenis-jenis krioprotektan antara lain DMSO, gliserol, propanadiol, sukrosa, serum, manosa, rafinosa dan etilen glikol.

Etilen glikol merupakan cairan jenuh, tidak berwarna, tidak berbau, berasa manis dan larut sempurna dalam air. Berat molekul etilen glikol yang rendah (62,07) memberikan efek yang menguntungkan berupa permeabilitas yang lebih tinggi (Gordon, 2003). Kelebihan etilen glikol sebagai krioprotektan adalah karena toksisitasnya yang rendah dan dapat mempertahankan daya hidup oosit. Hal inilah yang melatarbelakangi dibuatnya skripsi mengenai Pengaruh konsentrasi krioprotektan etilen glikol terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi oosit sapi Bali.

Tingginya pemotongan betina produktif di Rumah Potong Hewan menyebabkan ovarium berlimpah dan akan terbuang sia - sia, maka dari itu diperlukan penanganan ovarium secara cepat salah satunya yaitu dengan memanfaatkan teknologi fertilisasi in vitro (FIV) dengan cara pembekuan oosit atau kriopreservasi karena efektif dalam masa penyimpanan dan masa penggunaannya yang bisa sampai bertahun - tahun. Namun dalam proses pembekuan pada suhu yang sangat rendah ada kemungkinan terjadi cekaman dingin dan pembentukan kristal es yang dapat menyebabkan kerusakan morfologi oosit. Apakah dampak pada pembekuan dengan suhu yang sangat rendah dapat diatasi atau dikurangi dengan krioprotektan etilen glikol pada penggunaan konsentrasi yang terbaik.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh konsentrasi krioprotektan etilen glikol pada beberapa level yang berbeda terhadap maturasi dan tingkat fertilisasi oosit sapi Bali.

Kegunaan penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada peneliti dan pembaca tentang pengaruh konsentrasi krioprotektan etilen glikol terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi oosit sapi Bali.

Berdasarkan uraian sebelumnya maka dapat diambil hipotesis :

H1 : Penambahan etilen glikol di media krioprotektan dapat mempengaruhi tingkat maturasi dan tingkat fertilisasi oosit sapi Bali. setelah kriopreservasi.

TINJAUAN PUSTAKA

Aktivitas Ovarium

Saluran reproduksi betina merupakan salah satu sistem dalam tubuh hewan yang mengalami perkembangan dan perubahan morfologi saat terjadi kebuntingan (Kimura *et al.*, 1999). Ovarium mengalami serangkaian perubahan morfologi dan fisiologi selama siklus estrus dan proses reproduksi. Ovarium mempunyai fungsi ganda, yaitu sebagai organ eksokrin yang menghasilkan oosit (sel telur) dan sebagai organ endokrin yang menghasilkan hormon steroid (estrogen dan progesteron) (Jalaluddin, 2014).

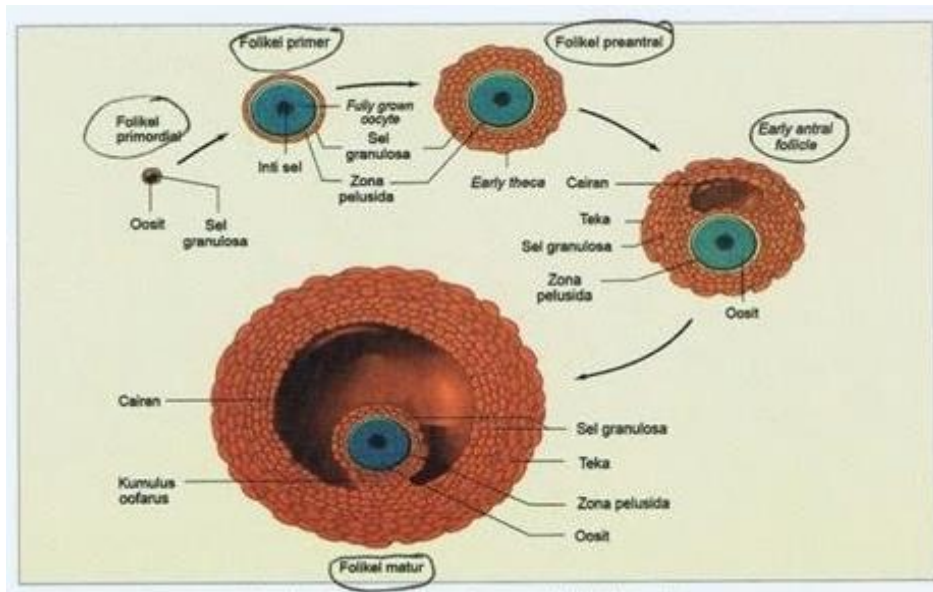
Ovarium terletak di dalam kavum abdominalis, menggantung, dan bertaut melalui mesovarium ke uterus (Hamny, 2006). Struktur, bentuk, dan ukuran ovarium masing-masing hewan sangat bervariasi tergantung kepada spesies, umur, tahap siklus seksual dan jumlah anak yang dilahirkan (Hafez dan Hafez, 2000). Ovarium sebelah kanan biasanya lebih besar daripada ovarium sebelah kiri. Sapi memiliki ovarium dengan ukuran panjang sekitar 3,8 cm, lebar 2 cm, dan tinggi 1,5 cm (Frandsen *et al.*, 2003).

Bentuk dan ukuran ovarium berbeda-beda berdasarkan spesies hewan, umur, dan status reproduksi struktur yang berada didalamnya. pada sapi ovarium berbentuk oval dan bervariasi dalam ukuran, panjang dan lebar. Ovarium terbagi atas dua yaitu ovarium kiri dan ovarium kanan. ovarium kanan dan kiri pada sapi memiliki perbedaan aktivitas (Sobari, 2012) hal ini disebabkan karena inervasi saraf dan pembuluh darah ke ovarium kanan dan kiri sama dan hal ini menunjukkan bahwa sapi bali lebih fertil dibandingkan dengan ternak sapi lainnya (Pemayun, 1986).

Perkembangan folikel ovarium pada sapi ditandai dengan adanya gelombang pertumbuhan folikel ovarium. Satu gelombang didefinisikan sebagai suatu proses pertumbuhan folikel yang sinkron dari beberapa folikel kecil. Dari kelompok folikel kecil tersebut, salah satu diantaranya akan terseleksi dan tumbuh menjadi folikel dominan, sedangkan folikel lainnya akan terhenti pertumbuhannya dan menuju atresi. Setelah mencapai ukuran maksimal, folikel dominan juga akan mengalami atresi dan regresi. Atresi dari folikel dominan akan menyebabkan pertumbuhan gelombang folikel baru. Selama periode siklus estrus terjadi dua sampai tiga gelombang folikel. Pada gelombang yang kedua folikel dominannya akan menjadi folikel ovulatori sedangkan folikel dominan dari gelombang ketiga akan mengalami ovulasi. Gelombang pertumbuhan folikel terjadi bukan hanya selama siklus estrus, namun juga telah terjadi sebelum pubertas, selama kebuntingan dan selama periode post partus (Rasbi dan Vinton, 2001).

Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan suatu proses perkembangan folikel di dalam korteks ovarium yang melibatkan beberapa proses yaitu rekrutmen, seleksi, pertumbuhan, pematangan dan ovulasi (Campbell *et al.*, 2010). Proses perkembangan dan maturasi folikel dikontrol oleh pars distalis pada kelenjar hipofisa, yaitu dengan mensekresikan FSH, LH dan prolaktin pada beberapa spesies (Anwar, 2005).



Gambar 1. Proses folikulogenesis
Sumber : Amir (2014)

Proses folikulogenesis seperti Gambar 1 dimulai pada tahap pertama yaitu tahap pre-ovulasi dengan diambilnya folikel primordial ke dalam suatu kumpulan yang berisi folikel - folikel yang sedang tumbuh berkembang (Rosadi dkk, 2011), lalu oosit membesar sel folikel jadi kubus atau silindris, lalu bermitosis membentuk sel-sel granulosa, yang terdiri dari beberapa lapis menandakan perubahan folikel primordial menjadi folikel primer. Folikel sekunder di tandai dengan aktifitas mitosis folikel tinggi dan menyebabkan bertambahnya lapisan sel granulosa yang disebut membran granulosa. Folikel tersier ditandai dengan pembentukan rongga berisi cairan yang berdampingan dengan oosit dan disebut antrum dan folikel de graaf struktur dasar dari folikel matang sudah terbentuk. Perkembangan oosit pada tahap ini berlangsung sampai dengan metafase pada meiosis II, dan setelah itu berhenti (Heffner dan Schust, 2008).

Tahap yang kedua yaitu tahap ovulasi. Pada hari ketiga belas folikel akan membentuk sebuah bukaan yang disebut stigma dan melepaskan oosit bersama sel kumulus dalam proses yang disebut ovulasi. Oosit sekarang memiliki kemampuan

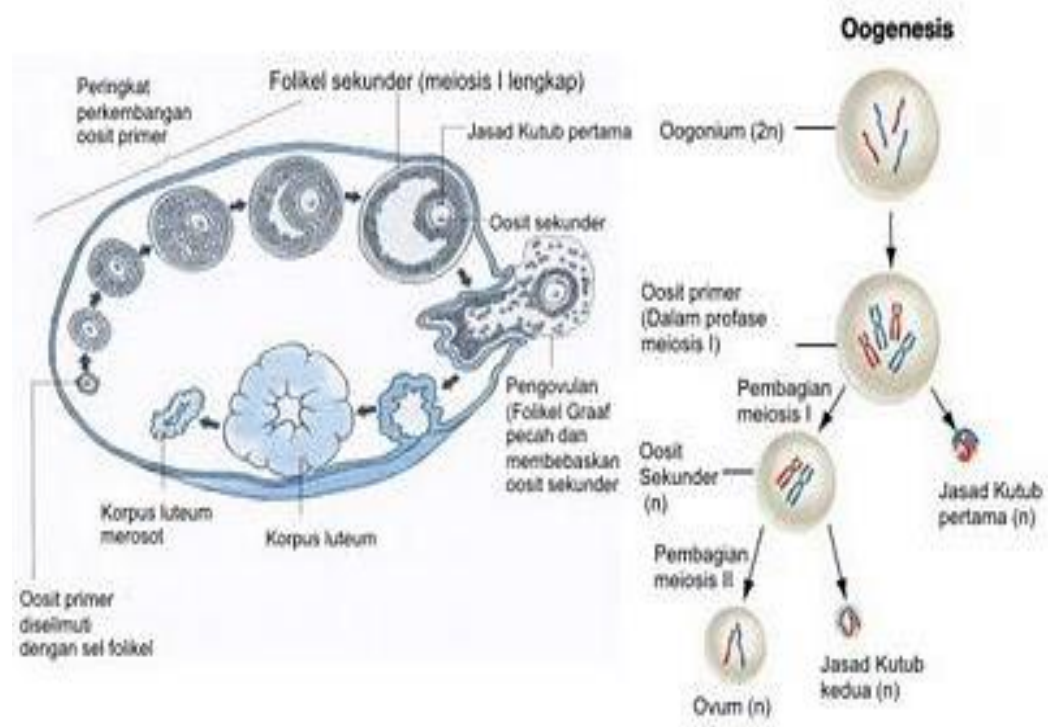
untuk melakukan fertilisasi dan akan bergerak turun menuju tuba falopi dan pada akhirnya diimplantasikan di uterus (Ownby, 2007).

Tahap yang ketiga disebut tahap post ovulasi. Setelah ovulasi, peluruhan dari folikel yang tersisa biasanya menghasilkan struktur yang disebut corpus hemorrhagicum, folikel yang pecah segera terisi darah. Pendarahan ringan dari folikel ke dalam rongga abdomen dapat menimbulkan iritasi peritoneum dan nyeri abdomen bawah singkat (*mittelschmerz*). Sel-sel granulosa dan teka yang melapisi folikel mulai berproliferasi, dan bekuan darah dengan cepat diganti oleh sel luteal (Ganong, 2003).

Luteinizing Hormone (LH) dari kelenjar pituitari mengarahkan luteinisasi dan menstimulasi sel granulosa untuk menghasilkan progesteron. Sel granulosa berproliferasi membesar dan berubah menjadi sel granulosa lutein. kumpulan lipid berpigmen kuning (*lutein*) dan lipid-lipid lainnya menandai perubahan menjadi sel granulosa lutein. Sel-sel pada teka internal juga bertransformasi menjadi lipid pembentuk sel yang disebut sel teka lutein. Jika terjadi fertilisasi, corpus luteum dipertahankan dan mensekresikan progesteron (Ownby, 2007).

Oogenesis

Oogenesis adalah proses pembentukan sel telur (*ovum*) di dalam ovarium. Oogenesis dimulai dengan pembentukan bakal sel-sel telur yang disebut *oogonia* (tunggal: *oogonium*). Pertumbuhan oosit antara lain berupa peningkatan diameter oosit, penambahan ukuran dari organel-organel, dan disertai dengan perubahan atau perkembangan pada inti dan sitoplasma (Telfer and Sharpley, 2008).

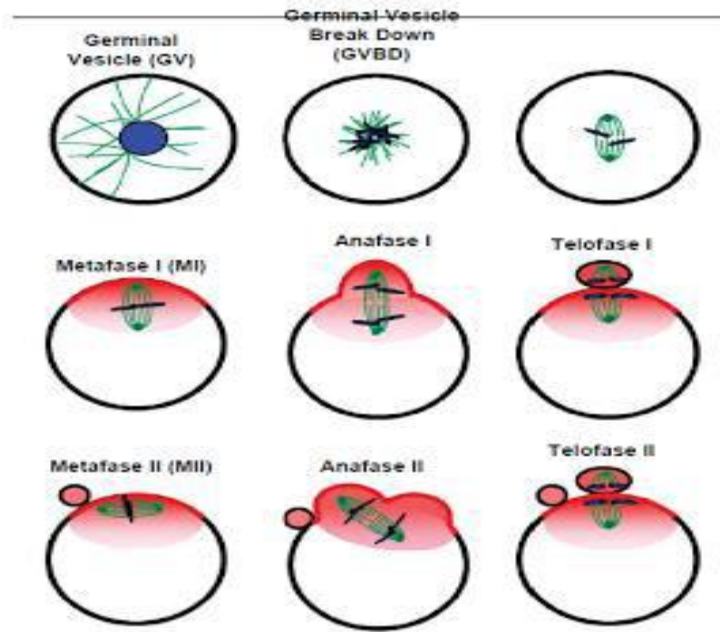


Gambar 2. Proses Oogenesis
Sumber: Campbell *et al.*, (2000)

Proses oogenesis seperti Gambar 2 terdiri dari beberapa tahap yaitu oogonium mengalami pembelahan mitosis berubah menjadi oosit primer, yang memiliki 46 kromosom. Oosit primer melakukan meiosis (tahap I), yang menghasilkan dua sel anak yang ukurannya tidak sama. Sel anak yang lebih besar adalah oosit sekunder yang bersifat haploid (n). Ukurannya lebih besar dari yang lain karena berisi lebih banyak sitoplasma dari oosit primer yang lain. Sel anak yang lebih kecil disebut badan polar pertama yang kemudian membelah lagi. Oosit sekunder meninggalkan folikel ovarium menuju tuba fallopi. Apabila oosit sekunder dibuahi oleh sel sperma (fertilisasi), maka akan mengalami pembelahan meiosis yang kedua, begitu pula dengan badan polar pertama membelah menjadi dua badan polar kedua yang akhirnya mengalami degenerasi (Telfer and Sharpley, 2008).

Selama pembelahan meiosis kedua, oosit sekunder menjadi bersifat haploid (n) dengan 30 kromosom dan selanjutnya disebut dengan oosit. Ketika inti nukleus sperma dan ovum siap melebur menjadi satu, saat itu juga oosit kemudian mencapai perkembangan akhir atau akhirnya menjadi ovum yang matang. Peristiwa pengeluaran sel telur dikenal dengan istilah ovulasi. Pada setiap ovulasi hanya satu telur yang matang dan dapat hidup 24 jam. Jika ovum yang matang tersebut tidak dibuahi, maka sel telur tersebut akan mati dan luruh bersama dengan dinding rahim pada awal siklus menstruasi (Campbell *et al.*, 2000).

Perkembangan oosit terdiri dari tiga tahap yaitu proliferasi, pertumbuhan, dan pematangan. Pada tahap proliferasi terjadi proses mitosis oogonium menjadi beberapa oogonia yang terjadi pada saat pralahir atau sesaat setelah lahir kemudian oogonia berdiferensiasi menjadi oosit primer dengan inti tahap profase seperti pada gambar 3. Inti oosit pada tahap ini disebut germinal vesicle (GV) yang ditandai dengan adanya membrane inti yang utuh dan nucleus yang jelas. Selanjutnya oosit akan memasuki tahap pertumbuhan dan pematangan yang berlangsung bersamaan dengan proses perkembangan folikel. Pertumbuhan oosit ditandai dengan peningkatan diameter oosit dan penambahan ukuran dari organel-organel seperti kompleks golgi, retikulum endoplasmik halus, butir lemak, peningkatan proses transkrip untuk sintesis protein. Tahap pematangan oosit ditandai dengan beberapa proses perkembangan inti oosit (Hafez and Hafez, 2000).



Gambar 3. Proses Pembelahan Meiosis pada Oosit
Sumber : Citra (2013).

Proses pembelahan oosit secara meiosis pada Gambar 3 menjelaskan tentang mekanisme pengaturan dan fisiologi perkembangan oosit primer secara singkat. Awal pembelahan meiosis dimulai dari janin, pada saat itu inti oosit berada pada tahap pembelahan profase I, atau tahap dictyate (fase istirahat). Proses pembelahan meiosis pada oosit dilanjutkan kembali setelah individu hewan mengalami pubertas (Hafez and Hafez, 2000). Kelanjutan pembelahan meiosis berturut-turut akan melewati tahap diakinesis (awal pemisahan dan kondensasi pasangan kromosom), metafase (semua kromosom berada pada pusat pembelahan) dan anaphase (pemisahan masing-masing kromosom sepanjang pusat belahan spindle) dan telofase (pembagian kromosom selesai).

Maturasi in vitro

Perkembangan bioteknologi reproduksi ternak telah banyak menghasilkan manfaat bagi manusia khususnya dalam industri peternakan. Teknologi-teknologi

tersebut antara lain adalah inseminasi buatan (IB) yang telah memasyarakat di daerah-daerah dan sudah membuahkan hasil (Rustanto dan Sugiono, 1997) dan transfer embrio (TE) yang saat ini masih dikembangkan dapat dilakukan untuk memperbanyak embrio. Untuk keperluan transfer embrio dibutuhkan embrio dalam jumlah yang banyak. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan aplikasi teknologi in vitro fertilization (IVF) meliputi in vitro maturation (IVM) dan in vitro culture (IVC).

Ovarium sapi yang berasal dari rumah potong hewan (RPH) sesaat setelah penyembelihan dapat dimanfaatkan sebagai sumber oosit untuk keperluan maturasi in vitro sehingga dapat memudahkan fertilisasi in vitro (Pujol *et al.*, 2004), namun keberhasilan IVF sampai ke tahap blastosist sangat tergantung pada beberapa faktor diantaranya jenis suplemen yang digunakan dalam media maturasi in vitro (Hammam *et al.*, 2010), kualitas oosit yang digunakan (Lonergan *et al.*, 2003) serta resiko kontaminasi dan kondisi kultur (Sagirkaya *et al.*, 2007). Jenis suplemen, kualitas oosit serta kondisi kultur yang baik sangat mendukung untuk meningkatkan kemampuan maturasi oosit in vitro.

Optimalisasi maturasi in vitro oosit antara lain adalah pengklasifikasikan oosit, penambahan zat. Aditif berupa faktor pertumbuhan dan hormon (Shen *et al.*, 2008), maupun berbagai macam serum. Klasifikasi oosit yang didasarkan pada kelengkapan struktur oosit sangat mempengaruhi maturasi in vitro dan perkembangan oosit sampai ke tahap blastosist (Alm *et al.*, 2005). Penggunaan serum seperti fetal calf serum (FCS) banyak digunakan dalam produksi embrio (Sagirkaya *et al.*, 2007) karena mengandung epidermal growth factor (EGF) yang berperan sebagai regulator intraovarian dalam proses maturasi oosit (Mtango *et al.*, 2003).

Pematangan ini meliputi berbagai perubahan kronologi tahapan meiosis (Gordon, 2003). Proses pematangan inti berhubungan dengan aktivitas sintesis RNA, ditandai dengan perubahan inti dari fase diploten ke metaphase II. Membran inti akan mengadakan penyatuan dengan vesicle membentuk germinal vesicle (GV) dan kemudian akan mengalami pelepasan membran inti membentuk germinal vesicle break down (GVBD). Setelah GVBD terjadi, kromosom dibungkus oleh mikrotubulus dan mikrofilamen yang sangat mempengaruhi keberhasilan pembelahan meiosis. Oosit yang telah mengalami GVBD selanjutnya akan mencapai tahap metaphase I (MI). Pada oosit sapi, metaphase I terjadi setelah 12-14 jam inkubasi dan diikuti oleh tahap anaphase (AI) dan telophase (TI) yang berlangsung relative singkat (14-18 jam) setelah masa inkubasi (Chohan and Hunter, 2003). Tahap metaphase II (MII) akan terjadi dan ditandai dengan terbentuknya badan kutub I dan oosit yang sudah matang siap untuk difertilisasi.

Pada proses pematangan sel telur secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya medium pematangan, lingkungan penyimpanan (Incubator). morfologi cumulus, ukuran folikel, kesehatan folikel, stimulasi ovarium dan prosedur pematangan oosit. Agar menunjang keberhasilan proses maturasi *in vitro* dilakukan inovasi komposisi dan penambahan suplemen untuk mendapatkan kondisi medium yang optimal. Suplemen seperti serum, hormon estradiol, hormon gonadotropin (FSH dan LH), mineral, glukosa, piruvat dan asam amino ditambahkan untuk membantu transformasi inti (Sirard dan Blondin, 1996).

Fertilisasi *in vitro* (FIV)

Teknologi *in vitro fertilization* (IVF) merupakan teknologi produksi embrio pada lingkungan buatan di luar tubuh dalam suatu sistem biakan sel (Hunter, 1995). Teknik fertilisasi *in vitro* dapat menggunakan oosit yang berasal dari

hewan yang masih hidup maupun dari oosit hewan yang telah dipotong, sehingga teknik fertilisasi *in vitro* ini dapat menjadi alternatif produksi embrio dalam pelaksanaan transfer embrio (TE). Manfaat lain dari teknologi IVF adalah membuka peluang yang lebih besar untuk mengembangkan teknik manipulasi gamet dan embrio seperti produksi kloning (Gordon, 1994).

Teknologi FIV pada ternak, khususnya sapi yaitu salah satu usaha memanfaatkan limbah ovarium dari induk sapi betina yang dipotong di Rumah Potong Hewan baik pada ternak yang masih hidup ataupun ternak yang telah dipotong. Fertilisasi *in vitro* ini diharapkan dapat memproduksi embrio sapi dalam jumlah massal untuk dititipkan pada induk resipien, sehingga dapat diperoleh ternak dalam jumlah banyak untuk meningkatkan populasi ternak di Indonesia (Kaiin dkk., 2008).

Penerapan bioteknologi ini membutuhkan oosit dalam jumlah yang banyak, selanjutnya oosit yang diperoleh dimatangkan secara invitro (*invitro maturation*) untuk kepentingan fertilisasi *in vitro*. Keberhasilan fertilisasi *in vitro* memerlukan kesiapan yang memadai dari oosit dan sperma secara biologis dan kondisi kultur yang mendukung efektifitas metabolisme dari gamet jantan dan betina. Berbagai aspek kondisi kultur seperti medium, waktu inseminasi dan kapasitas, sistem kultur terus diidentifikasi untuk meningkatkan keberhasilan fertilisasi *in vitro* (Bracket dan Zuelke, 1993).

Proses fertilisasi ini hanya dapat terjadi setelah didahului proses kapasitas spermatozoa (Gordon, 2003) dan maturasi oosit. Pada saat fertilisasi *in vitro* dan perkembangan embrio, sel kumulus memberikan pengaruh positif (Nandi *et al.*, 1998). Sel-sel kumulus mampu meningkatkan area kontak antara spermatozoa dan oosit (Cox *et al.*, 1993) dan dengan memilih sub populasi sperma yang mampu

berinteraksi dengan oosit (Gasparrini, 2002). Ditambahkan oleh Kusindarta (2009) bahwa sel-sel kumulus penting dalam meningkatkan maturasi sitoplasmik yang normal oosit untuk kepentingan pembentukan pronukleus dan kemampuan melanjutkan perkembangan.

Dalam penelitian Kusindarta (2009) diketahui bahwa oosit yang dimaturasi 20 jam telah mencapai stadium metafase kedua, sehingga dapat difertilisasi. Selain kapasitas spermatozoa, kematangan oosit juga berperan penting dalam keberhasilan fertilisasi. Vanderhyden dan Armstrong (1989) menemukan bahwa oosit dengan sel-sel kumulus mempunyai kemampuan terfertilisasi lebih tinggi dari pada oosit yang dimaturasi tanpa sel-sel kumulus. Sel-sel kumulus penting dalam meningkatkan maturasi sitoplasmik yang normal oosit untuk kepentingan pembentukan pronukleus dan kemampuan melanjutkan perkembangan (Kusindarta, 2009).

Selain itu, pada penelitian Gunawan *et al.* (2014) yang menggunakan *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) menunjukkan bahwa perkembangan pronukleus dengan terbentuknya 2-PN terjadi dengan kombinasi proses aktivasi oleh spermatozoa dan aktivasi dengan strontium telah mampu menginisiasi fluktuasi Ca^{2+} pada oosit sehingga terbentuk pronukleus betina dan pronukleus jantan.

Pembentukan PN betina pada oosit dimulai dengan terjadinya proses aktivasi oleh faktor spermatozoa yang disebut *sperm oocyte activating factor* (SAF) yang akan melepaskan oosit dari tahap MII sehingga berlanjut ke tahap selanjutnya. Adapun prosesnya dimulai dengan inisiasi fluktuasi Ca^{2+} dari dalam retikulum endoplasma sehingga aktivitas MPF menurun. Pembentukan PN jantan kemungkinan disebabkan terdapatnya kandungan *gluthation* (GSH) pada

sitoplasma yang relatif tinggi sehingga mendukung pula inisiasi awal pembentukan PN jantan. Proses setelah spermatozoa diinjeksikan ke dalam oosit dan dilanjutkan aktivasi dengan strontium menyebabkan terjadinya proses biokimia yang simultan dan saling berkesinambungan antara oosit dan spermatozoa sampai masing-masing terbentuk PN (Gunawan *et al.* 2014).

Kriopreservasi dan Krioprotektan

Secara teoritis, kriopreservasi berasal dari kata krio yang berarti beku, dan preservasi yang berarti penyimpanan pada temperatur rendah. Jadi kriopreservasi adalah teknik penyimpanan materi genetik dalam keadaan beku pada temperatur rendah atau suatu teknik penyimpanan sel hewan, tumbuhan dan materi genetika lainnya (termasuk semen dan oosit) dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel di dalam sel, fungsi fisiologi, biologi, dan morfologi (Suprianata dan Pasaribu, 1992).

Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi sel spermatozoa atau oosit ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Prinsip perpindahan air keluar masuk membran, baik dehidrasi sebelum deep freezing maupun dehidrasi pada saat pencairan kembali (thawing) menjadi perhatian khusus.

Terdapat dua metode kriopreservasi yaitu metode konvensional dan vitrifikasi. Kedua metode ini mempunyai kelebihan dan kekurangan. Pada awalnya kriopreservasi dilakukan menggunakan metode konvensional, namun saat ini metode vitrifikasi lebih sering diaplikasikan. Kelebihan dari metode vitrifikasi adalah pemadatan cairan tanpa melalui pembentukan kristal es (Shaw *et*

al., 2000). Metode tersebut sederhana, murah, dan tidak memerlukan alat khusus untuk menurunkan suhu secara bertahap sehingga mudah diaplikasikan ditempat yang memiliki kontainer nitrogen cair.

Ada dua faktor utama selama proses kriopreservasi sel spermatozoa atau oosit yang dapat menurunkan viabilitas sel, yaitu kejutan dingin (cold-shock) dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan kristal es. Selain itu ada beberapa faktor tambahan, yaitu peroksidasi lipid dan faktor antibeku pada plasma semen seperti egg-yolk coagulating enzyme, trigliserol lipase, dan faktor antimotilitas (Gazali dan Tambing, 2002).

Kejutan dingin terjadi karena adanya penurunan suhu secara mendadak pada suhu tubuh sampai di bawah 0°C yang akan menurunkan viabilitas sel. Fenomena kejutan dingin pada sel kemungkinan berkaitan dengan tahap transisi dari membran lipid yang menyebabkan terjadinya tahap pemisahan dan penurunan sifat-sifat permeabilitas secara selektif dari membran biologi sel hidup (Watson, 1995). Tingkat sensitivitas sel terhadap kejutan dingin dipengaruhi oleh tingkat pendinginan dan interval suhu (Watson, 2000). Dua tipe kerusakan pada sel akibat kejutan dingin dapat terjadi secara langsung dan tidak langsung yang bersifat laten (Amann, 1999).

Kerusakan langsung akan mempengaruhi struktur dan fungsi seluler, misalnya penurunan proses metabolisme, sedangkan kerusakan tidak langsung sulit untuk diamati dan baru terlihat setelah proses pencairan kembali. Pembentukan kristal es selama proses kriopreservasi sel spermatozoa atau oosit menyebabkan terjadinya penumpukan elektrolit di dalam sel. Hal tersebut mengakibatkan terjadi kerusakan sel secara mekanik. Elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas

membran plasma akan menurun dan sel akan mati. Pembentukan kristal es kemungkinan berkaitan dengan perubahan tekanan osmotik dalam fraksi yang tidak mengalami pembekuan (Watson, 2000).

Pada dasarnya tujuan utama kriopreservasi oosit ialah melestarikan plasma nutfah yang mendekati kepunahan dan mendukung program teknologi inseminasi buatan dan transfer embrio pada ternak. Keuntungan kriopreservasi ialah dapat disimpan dalam waktu yang tidak terbatas dan dapat digunakan kapan saja bila diperlukan (Toelihere, 1985). Selama proses kriopreservasi diperlukan suatu krioprotektan. Krioprotektan selain dapat melindungi sel juga ternyata diduga dapat menimbulkan kerusakan pada sel akibat pengaruh toksisitasnya. Derajat proteksi dari bahan krioprotektan terhadap proses kristalisasi pada masa pembekuan tergantung dari jenis dan konsentrasi krioprotektan yang dipakai serta lama paparan (Kasai, 2002).

Krioprotektan ialah zat kimia nonelektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Penambahan krioprotektan bertujuan untuk memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi (Kostaman dan Setioko, 2011).

Berdasarkan sifat fisikokimia dan daya permeabilitas membran maka krioprotektan dibagi atas dua kelompok, yaitu krioprotektan intraseluler, dapat keluar masuk membran karena memiliki bobot molekul kecil sehingga bersifat permeabel contoh gliserol, etilen glikol, propanadiol, dan krioprotektan ekstraseluler, tidak dapat keluar masuk membran karena memiliki bobot molekul

besar sehingga bersifat nonpermeatif contohnya yaitu protein, sukrosa, manosa, rafinosa, kuning telur, susu dan serum (Gazali dan Tambing, 2002). Pada proses kriopreservasi tersebut diperlukan krioprotektan yang dapat mengatasi atau mengurangi kejutan dingin dan pembentukan kristal es dan salah satu krioprotektan yang dapat digunakan yaitu etilen glikol.

Etilen glikol

Etilen glikol merupakan cairan jernih, tidak berwarna, tidak berbau, berasa manis dan larut sempurna dalam air. Etilen glikol sebagian besar digunakan sebagai bahan baku industri poliester yang merupakan bahan baku industri tekstil dan plastik (Kusumadewi, 2011) peningkatan konsentrasi etilen glikol pada suhu yang ekstrim dapat menghindarkan terjadinya kristal es intraseluler, sehingga mengurangi kerusakan yang terjadi akibat proses vitrifikasi (Mohammad dkk, 2005).

Faktor yang menentukan keberhasilan kriopreservasi bergantung pada teknik yang diterapkan yakni pada teknik pembekuan cepat. Untuk teknik pratumbuh, keberhasilan ditentukan oleh jenis dan komposisi krioprotektan dalam media tumbuh. Untuk teknik vitrifikasi, enkapsulasi-vitrifikasi dan droplet freezing, keberhasilan ditentukan oleh jenis, konsentrasi dan lama perendaman dalam krioprotektan. Etilen glikol efektif digunakan sebagai krioprotektan untuk kriopreservasi embrio dan diaplikasikan pula pada kriopreservasi oosit. Berat molekul etilen glikol yang rendah (62,07) memberikan efek yang menguntungkan berupa permeabilitas yang lebih tinggi. Kelebihan etilen glikol sebagai krioprotektan adalah karena toksisitasnya yang rendah. krioprotektan berkonsentrasi tinggi dapat mempertahankan daya hidup oosit sapi setelah proses vitrifikasi dan pencairan kembali (Gordon, 1994).

Pada penelitian Wahjuningsih (2010) menyatakan bahwa tingkat fertilitasi tertinggi dan terbaik pada pembekuan oosit menggunakan etilen glikol pada konsentrasi 30 % dengan lama paparan 3 menit . Adapula hasil penelitian lain yang dilakukan oleh Mohammad dkk (2005) menunjukkan bahwa ovarium mencit yang dibekukan dengan metode vitrifikasi menggunakan etilen glikol pada konsentrasi 15 % mampu tumbuh setelah autoplantasi di subkapsular ginjal dan folikel yang berhasil berkembang menunjukkan morfologi normal.

Penelitian Rimayanti (2005) menunjukkan bahwa vitrifikasi dengan etilen glikol pada konsentrasi 40 % dan lama waktu pemaparan 10, 20 dan 30 menit dapat mempertahankan viabilitas oosit pasca thawing. Penelitian Pamungkas (2010) tentang pemanfaatan metode vitrifikasi untuk kriopreservasi oosit mamalia menunjukkan bahwa penggunaan krioprotektan etilen glikol pada konsentrasi 15 % dan waktu pemaparan 20-30 detik pada suhu 37°C dapat meningkatkan penyerapan krioprotektan di dalam membrane sel oosit sehingga mengurangi colk shok. Penelitian Supriatna dkk (1999) menyatakan bahwa krioprotektan etilen glikol pada konsentrasi 1,5 M menghasilkan viabilitas embrio sapi terbaik tanpa adanya penambahan sukrosa.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada Mei - Juni 2017 bertempat di Laboratorium fertilisasi *in vitro* Pusat Kegiatan Penelitian (PKP), Universitas Hasanuddin.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah incubator, mikroskop (ZEISS, image A2 : Axio Cam HRc), Syringe (10 ml), scalpel, petri dish, gelas kimia, inkubator, labu enlemeyer, refrigerentor, timbangan analitik, kaca objek, pipet tetes, mikropipet, cawan petri, gunting bedah, scalpel, vinset, mikro pipet, bunsen, cover glass, thermometer, container.

Bahan yang digunakan adalah ovarium sapi Bali, Nacl 0,9 %, etilen glikol, aceto orcein 2 %, asam asetat 25 %, ethanol absolut, media fertilisasi, media fertilisasi, alcohol 70 % tissue, mineral oil, paraffin dan vaselin (1:10), spiritus, FBS (*fetal bovine serum*) , nitrogen cair, PBS (*phosphate buffered saline*), air dan penicillin streptomycin.

Materi Penelitian

Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimental laboratorium berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan dengan susunan sebagai berikut :

A : Kontrol (100% PBS)

B : Penggunaan medium krioprotektan etilen glikol 10% dan PBS 90 %.

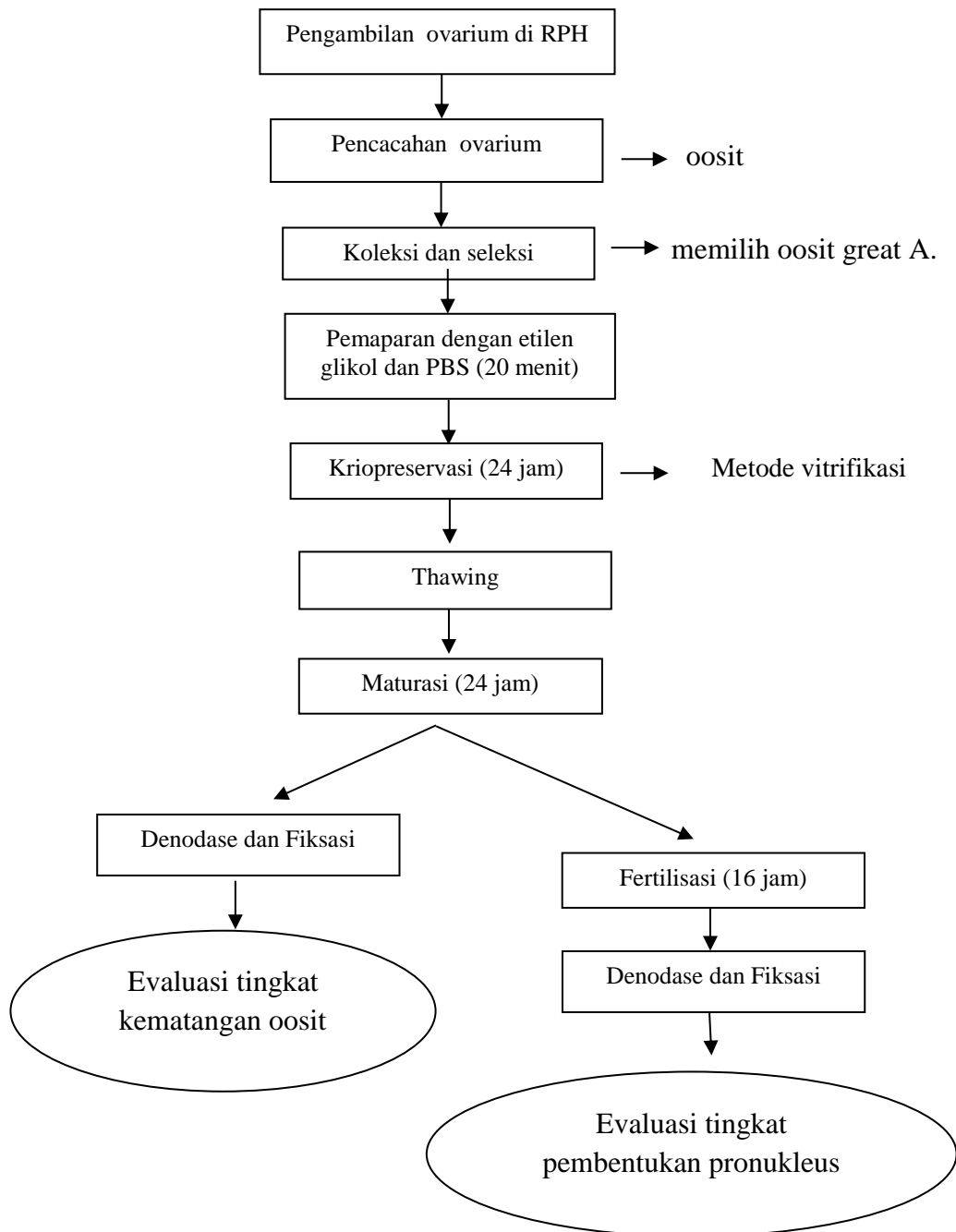
C : Penggunaan medium krioprotektan etilen glikol 20% dan PBS 80 %.

D : Penggunaan medium krioprotektan etilen glikol 30% dan PBS 70 %.

sebagai ulangan yaitu frekuensi pengambilan ovarium di Rumah Potong Hewan.

Prosedur Penelitian

Diagram alir prosedur selama penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.



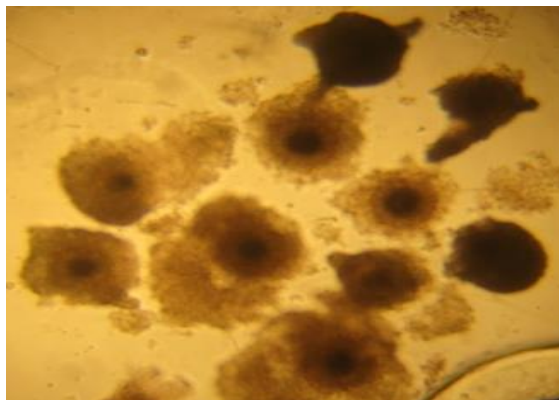
Gambar 4: Diagram Alir Prosedur Penelitian

Pengambilan ovarium. Ovarium sapi segar dikumpul di rumah potong hewan dan dibawa ke laboratorium dengan larutan NaCl 0,9 %.

Pencacahan ovarium dan koleksi. Ovarium yang sudah dikumpulkan kemudian dicacah (slicing) dengan media PBS (*Posphate buffered saline*) agar

folikel yang ada di permukaan ovarium dapat pecah dan diharapkan oosit akan keluar bersama cairan folikel selanjutnya dibilas (flushing) dengan PBS (*Posphate buffered saline*). Kemudian koleksi oosit dilakukan di bawah mikroskop dan menampungnya di petri dish yang berisi medium koleksi yaitu *phosphate buffered saline* (PBS; Gibco, Grand Island, NY,USA), *fetal bovine serum* dan penicillin streptomycin.

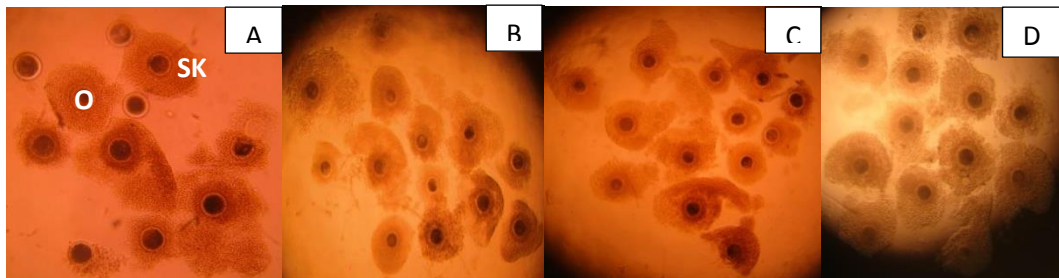
Seleksi, oosit yang diseleksi adalah oosit *grade A* yang dicirikan oleh terdapat beberapa lapisan sel kumulus utuh dan kompak, ooplasma rata, dan tidak bergranula. Kemudian ditampung dalam petri dish yang berisi media koleksi dan mencucinya sebanyak 2 kali dengan PBS. Kualitas oosit *grade A* yang terpilih dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Oosit *grade A* yang terpilih

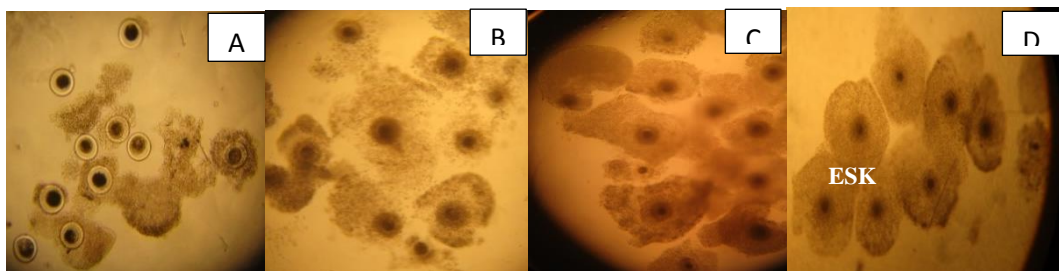
Kriopreservasi dan thawing, kriopreservasi dengan metode vitrifikasi yaitu dimulai dengan pemaparan oosit di media krioprotektan etilen glikol dan PBS (*phosphate buffered saline*) dengan konsentrasi etilen glikol 0%, 10%, 20% dan 30% selama 20 menit. Kemudian di masukan kedalam straw ukuran 250 ul selanjutnya diletakan di permukaan container selama 10 detik untuk menghindari kejutan dingin lalu dimasukan dan disimpan di dalam kontainer yang berisikan nitrogen cair selama 24 jam. Setelah kriopreservasi maka di thawing pada suhu

37°C selama 20 detik kemudian mengevaluasi perkembangan oosit dari segi morfologi serta viabilitas. Oosit setelah kriopreservasi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Oosit setelah kriopreservasi. A : control (100% PBS), B : 10% EG + 90% PBS, C : 20% EG + 80% PBS, D : 30% EG + 70% PBS. SK : sel kumulus, O : oosit.

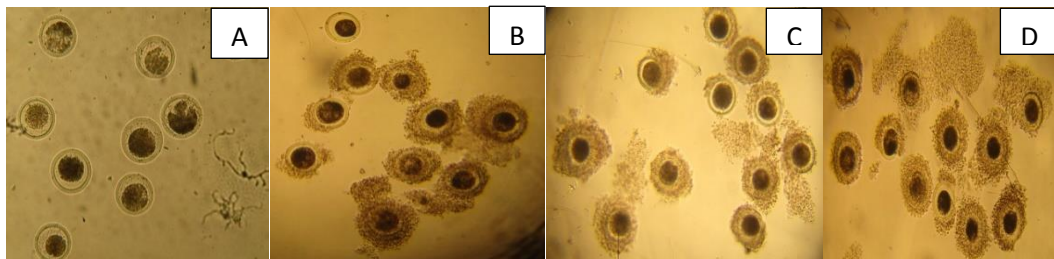
Maturasi. setelah di thawing dilakukan pencucian pada oosit di media maturasi (TCM, fetal bovine serum, hormone PMSG, hormone HCG, dan penicillin streptomycin) sebanyak 2 kali dan oosit di masukan kedalam media maturasi yang telah di buat dengan empat tetesan (drop) pada petri dish dan ditutup dengan mineral oil agar tidak kering lalu di masukan ke inkubator CO₂ 5%, temperature 38,5°C selama 24 jam. Oosit yang telah di maturasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Oosit yang telah di maturasi. ESK : ekspansi sel-sel kumulus. A : control (100% PBS), B : 10% EG + 90% PBS, C : 20% EG + 80% PBS, D : 30% EG + 70% PBS.

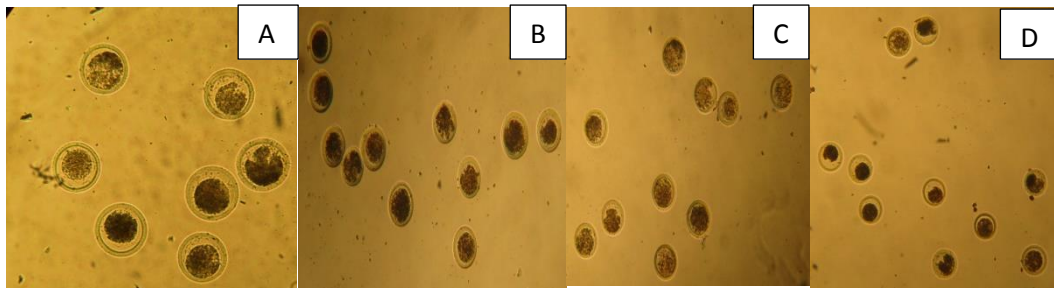
Fertilisasi, pertama straw berisi sperma beku di thawing pada suhu 37°C selama 20 detik, selanjutnya dimasukkan ke dalam media fertilisasi yang telah disiapkan kemudian disentrifuge selama 5 menit pada kecepatan 1800 rpm. Setelah disentrifuge, supernatant dibuang. Selanjutnya endapan semen ditambahkan lagi dengan media fertilisasi yang kedua kemudian disentrifuge

kembali dengan waktu dan kecepatan yang sama. Setelah disentrifuge, supernatant dibuang dan selanjutnya semen ditambahkan lagi media fertilisasi lalu dipipet berulang ulang dan dibuat dalam bentuk drop pada dish fertilisasi. Lapis menggunakan mineral oil \pm 3 ml hingga menutupi seluruh permukaan media fertilisasi tersebut agar media dan oosit tidak kering. Oosit yang telah dimaturasi dikeluarkan dari inkubator, selanjutnya dicuci sebanyak 2 kali dengan media fertilisasi. Selanjutnya oosit di masukkan ke dalam dish yang telah berisi drop media fertilisasi dengan sperma. Selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator selama 16-18 jam. Oosit yang telah di fertilisasi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Oosit yang telah di fertilisasi. A : control (100% PBS), B : 10% EG + 90% PBS, C : 20% EG + 80% PBS, D : 30% EG + 70% PBS.

Denodase (membersihkan dari sel-sel kumulus). Oosit yang telah difertilisasi dibersihkan dari sel-sel kumulusnya (denudase) dengan PBS dan dipipet berulang-ulang menggunakan pipet berdiameter yang sesuai dengan ukuran oosit agar sel-sel kumulus tidak mengganggu pada saat pengamatan. Oosit yang telah bersih dari sel kumulusnya seperti pada Gambar 9 diletakkan pada drop diatas kaca objek, lalu difiksasi dengan kaca penutup yang memiliki bantalan parafin dan vaselin (1:9) pada keempat sudutnya. Oosit yang telah didenodase dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Oosit setelah denudase. A : control (100% PBS), B : 10% EG + 90% PBS, C : 20% EG + 80% PBS, D : 30% EG + 70% PBS.

Fiksasi dan evaluasi oosit. Preparat oosit yang telah jadi, difiksasi pada ethanol dan asam asetat dengan perbandingan (3:1) selama 3-4 hari pada temperatur kamar. Setelah 3-4 hari difiksasi preparat berisi oosit direndam kembali dalam larutan ethanol absolute selama satu jam. Kemudian diwarnai dengan aceto arcein 2% selama 2 menit. Kemudian zat pewarna dibersihkan dengan asam asetat 25% dan selanjutnya dilakukan pengamatan dibawah mikroskop Axio cam.

Parameter

Parameter yang diamati dalam penelitian ini yaitu tingkat maturasi oosit dan tingkat fertilisasi.

1. Tingkat maturasi oosit, meliputi :

- a. Fase germinal vesicle (GV) ditandai dengan adanya membran inti dan nukleolus terlihat jelas ditepi;
- b. Fase germinal vesicle breaking down (GVBD) ditandai dengan robeknya membran inti sehingga nukleolus tidak terlihat jelas;
- c. Fase metaphase-I (M-I) ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berpasangan dan berderet di bidang equator;
- d. Fase metaphase-II (M-II) ditandai adanya badan kutub I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap M-I, fase anaphase dan telofase.

Tingkat maturasi oosit dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Tingkat maturasi} = \frac{\text{Jumlah oosit yang mengalami kematangan}}{\text{jumlah oosit yang dimatangkan}} \times 100$$

2. Tingkat fertilisasi, meliputi :

- a. Oosit terfragmentasi atau oosit yang tidak mencapai perkembangan metafase II (0 PN);
- b. Oosit yang mempunyai 1 pronukleus (1 PN) yang hanya terdiri atas pronukleus betina;
- c. Oosit yang mempunyai 2 pronukleus (2 PN) yang terdiri atas pronukleus jantan serta betina;
- d. Oosit terfertilisasi yang memiliki dua atau lebih pronukleus (>2 PN).

Tingkat fertilisasi oosit dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Tingkat fertilisasi} = \frac{\text{jumlah oosit yang mengalami pembentukan pronukleus}}{\text{jumlah oosit yang difertilisasi}} \times 100$$

Analisis Data

Tingkat maturasi dan tingkat fertilisasi oosit dianalisis dengan *analysis of variance* (ANOVA) terlebih dahulu ditransformasi dengan $\text{Arsin } \sqrt{\text{Persentase}}$ untuk memperoleh penyebaran data distribusi normal (Gaspersz, 1991) dan apabila terdapat pengaruh diantara perlakuan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) (Steel and Torrie, 1993). Dengan model matematika sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_i$$

$$i = 1, 2, 3, 4$$

$$j = 1, 2, 3, 4$$

Keterangan :

Y_{ij} = Hasil pengamatan dari tingkat kematangan oosit dengan konsentrasi krioprotektan etilen glikol ke-i dengan ulangan ke-j

μ = Rata-rata pengamatan

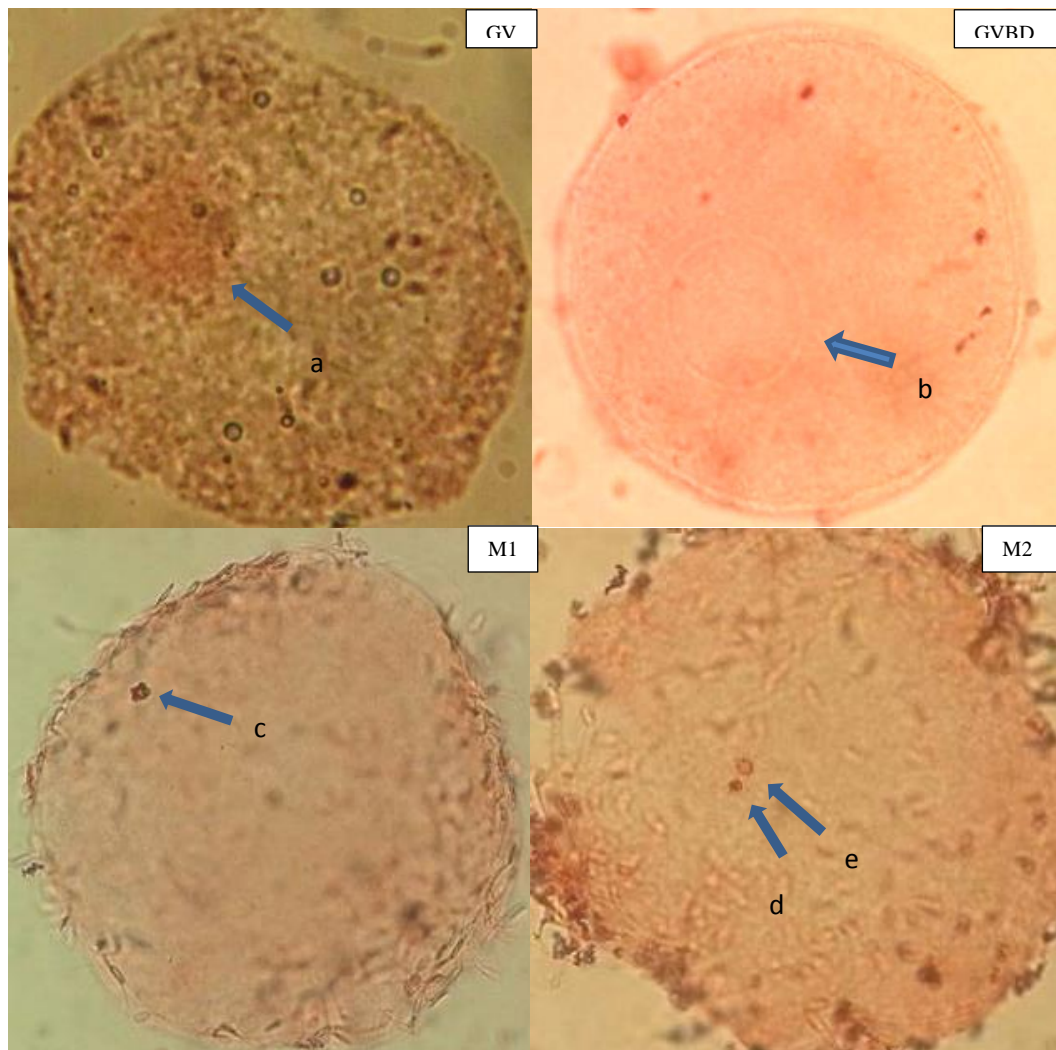
t_i = Pengaruh konsentrasi krioprotektan etilen glikol ke-i

ε = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Tingkat Maturasi Oosit Sapi Bali

Status inti oosit yang dikriopreservasi dengan menggunakan krioprotektan etilen glikol dan dimaturasi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 10. Status inti oosit setelah pematangan *in vitro*. GV : Germinal visicle GVRD : Germinal vicicle break down , M1 : Metaphase – I dan M2: Metaphase – II (tanda panah).

Gambar 6. GV.a menunjukkan tingkat maturasi oosit sapi Bali fase *germinal vesicle* ditandai dengan adanya membran inti dan nukleolus terlihat jelas ditepi, Gambar 6. GVRD.b fase *germinal vesicle breaking down* ditandai dengan robeknya membran inti sehingga nukleolus tidak terlihat jelas, Gambar 6. M1.c

metaphase-I ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berpasangan dan berderet di bidang equator dan Gambar 6.MII.d.e terdapat *metaphase-II* ditandai adanya badan kutub I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap M-I, fase anaphase dan telofase.

Data hasil pengamatan tingkat maturasi oosit sapi Bali yang dikriopreservasi menggunakan krioprotektan etilen glikol dan dimaturasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil persentase tahapan pematangan oosit sapi Bali yang dikriopreservasi menggunakan etilen glikol dan dimaturasi.

Perlakuan	Σ oosit	Tahapan Pematangan Oosit (%)			
		GV	GVBD	M-I	M-II
Kontrol	40	20 ^a	0	32.5 ^a	47.5 ^a
10% EG	40	20 ^a	0	25 ^{ab}	50.5 ^a
20% EG	40	10 ^a	0	22.5 ^b	67.5 ^b
30% EG	40	7.5 ^b	0	15 ^c	77.5 ^c

Keterangan : GV: *germinal vesicle*, GVBD: *germinal vesicle break down*, M-I: *metaphase I*, M-II: *metaphase II*. Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$).

Hasil analisis ragam (Lampiran 8) menunjukkan bahwa kriopreservasi oosit sapi Bali dengan menggunakan krioprotektan etilen glikol berpengaruh nyata ($P<0.05$) terhadap tingkat maturasi oosit sapi Bali. Tahap *germinal vesicle* (GV) persentasenya nyata ($P<0.05$) lebih rendah dari ketiga perlakuan, persentase metaphase I (M-I) nyata lebih tinggi dari pada kontrol dibandingkan dengan ketiga perlakuan dan terendah pada perlakuan 30% etilen glikol, pada persentase metaphase II (M-II) nilai tertinggi sangat nyata ($P<0.01$) pada perlakuan A (30% etilen glikol). Kemudian disusul oleh perlakuan B (10% etilen glikol) dan C

(20% etilen glikol) dan nilai yang terendah yaitu pada kontrol atau tanpa etilen glikol.

Hal ini menggambarkan bahwa terjadi perubahan proporsi oosit yang cepat dari GV (*germinal vesicle*) ke M-II (*metaphase-II*) pada perlakuan etilen glikol 30% sehingga mengakibatkan persentase *germinal vesicle* sangat rendah dan persentase *metaphase-II* nyata tertinggi pada perlakuan 30%. Fenomena ini sama dengan perlakuan C (20% etilen glikol). Hal ini membuktikan bahwa proses kriopreservasi (pembekuan) dengan menggunakan krioprotektan etilen glikol tidak menghalangi tahapan perkembangan oosit ketika dimaturasi. Penggunaan etilen glikol pada level yang tepat mampu mengurangi cekaman dingin seperti pembentukan kristal es dan melindungi oosit pada proses kriopreservasi.

Oosit yang dikriopreservasi menggunakan krioprotektan etilen glikol memperlihatkan perubahan tahapan *germinal vesicle* ke tahapan *metaphase-II*. Hal tersebut disebabkan oleh penggunaan etilen glikol pada level yang tepat mampu mengurangi cekaman dingin dan melindungi oosit pada proses kriopreservasi sedangkan yang tidak ditambahkan etilen glikol memperlihatkan perubahan tahapan yang kurang baik yang ditunjukkan oleh presentase *germinal vesicle* tinggi dan tahapan *metaphase-II* rendah, ini terjadi karena kriopreservasi tanpa etilen glikol tidak mampu melindungi oosit pada saat pembekuan.

Proses kriopreservasi atau pembekuan oosit tanpa krioprotektan juga dapat menyebabkan sel-sel kumulus oosit mudah terlepas dan bahkan merusak organel sel. Diketahui bahwa sel-sel kumulus oosit berfungsi sebagai penyedia nutrisi bagi oosit melalui zat metabolit yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan pendapat Gazali dan Tambing (2002) yang menyatakan bahwa proses kriopreservasi oosit yang dapat menurunkan viabilitas sel, yaitu kejutan dingin

(cold-shock) dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan kristal es.

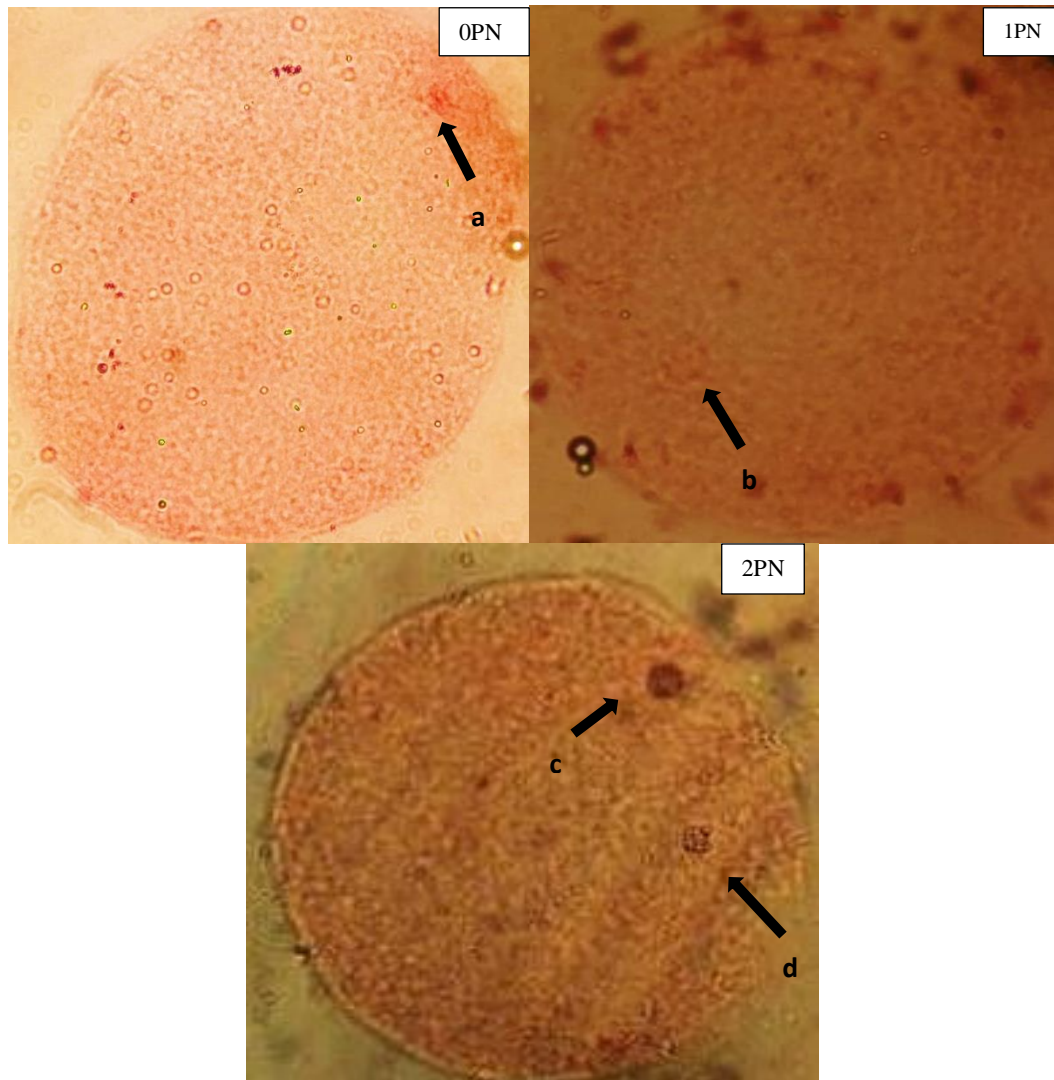
Kejutatan dingin terjadi karena adanya penurunan suhu secara mendadak sampai di bawah 0°C yang akan menurunkan viabilitas sel. Fenomena kejutatan dingin pada sel kemungkinan berkaitan dengan tahap transisi dari membran lipid yang menyebabkan terjadinya tahap pemisahan dan penurunan sifat-sifat permeabilitas secara selektif dari membran biologi sel hidup (Watson, 1995). Tingkat sensitivitas sel terhadap kejutatan dingin dipengaruhi oleh tingkat pendinginan dan interval suhu (Watson, 2000).

Pembentukan kristal es selama proses kriopreservasi oosit menyebabkan terjadinya penumpukan elektrolit di dalam sel. Hal tersebut mengakibatkan terjadi kerusakan sel secara mekanik. Elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati. Pembentukan kristal es kemungkinan berkaitan dengan perubahan tekanan osmotik dalam fraksi yang tidak mengalami pembekuan (Watson, 2000).

Dalam hal ini masalah kejutatan dingin dan pembentukan kristal es yang diakibatkan oleh proses kriopreservasi terbukti dapat diatasi dengan krioprotektan etilen glikol sesuai dengan pendapat (Gordon, 1994) yang menyatakan bahwa etilen glikol memiliki berat molekul yang rendah (62,07), memiliki permeabilitas yang tinggi dan termasuk krioprotektan intraseluler, ditambahkan oleh (Gazali dan Tambing, 2002) yang menyatakan bahwa krioprotektan intraseluler dapat keluar masuk membran tanpa adanya pembentukan kristal es karena memiliki bobot molekul kecil serta tidak merusak organ sel oosit

Pengaruh krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Tingkat Fertilisasi Oosit Sapi Bali

Hasil pengamatan tingkat pembentukan pronukleus oosit sapi Bali yang dikriopreservasi menggunakan krioprotektan etilen glikol yang dimaturasi dan di fertilisasi secara *in vitro* setelah pewarnaan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 11. Pembentukan pronukleus setelah fertilisasi. 0PN.a : Oosit yang tidak terfertilisasi, 1PN.b : Oosit tahap 1 pronukleus dan 2PN.c.d : oosit tahap 2 pronukleus (tanda panah).

Pada Gambar 7.0PN.a yaitu tidak terfertilisasi ditandai dengan tidak terbentuk pronukleus dan tampak adanya 1 polar body kemudian Gambar 7.1PN.b yaitu pembentukan 1 pronukleus yang hanya terdiri atas pronukleus betina dan dianggap tidak terfertilisasi dan Gambar 7.2PN.c.d terdapat oosit yang

terfertilisasi ditandai dengan pembentukan 2 pronukleus yang terdiri atas pronukleus jantan dan betina . Hal ini sesuai dengan pendapat Ducibella (2002) menyatakan bahwa oosit yang terfertilisasi ditandai oleh adanya beberapa kejadian seperti reaksi korteks, pembentukan pronukleus, dan pembelahan sel.

Data hasil pengamatan tingkat fertilisasi oosit sapi Bali yang dikriopreservasi menggunakan krioprotektan etilen glikol dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil persentase tingkat fertilisasi oosit sapi Bali yang dikriopreservasi menggunakan etilen glikol.

Perlakuan	Σ oosit	Pembentukan pronukleus (%)			Tingkat Fertilisasi
		PN-0	PN-1	PN-2	
Kontrol	40	75 ^a	15	10 ^a	10 ^a
10% EG	40	62.5 ^b	20	17.5 ^b	17 ^b
20% EG	40	55 ^b	15	30 ^b	30 ^b
30% EG	40	37,5 ^c	30	32.5 ^b	32.5 ^b

Keterangan : PN0 : tidak terfertilisasi, PN1 : memiliki 1 *pronukleus*, dan PN2 : memiliki 2 *pronuklues*. Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Berdasarkan uji statistik (lampiran 9) menunjukkan bahwa kriopreservasi menggunakan krioprotektan etilen glikol berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap tingkat fertilisasi oosit sapi Bali. Pada tahap PN-0 persentasenya sangat nyata ($P < 0.01$) lebih tinggi dari ketiga perlakuan lainnya. Persentase PN-1 tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) antara perlakuan. Persentase PN-II nilai tertinggi sangat nyata ($P < 0.01$) pada perlakuan D (etilen glikol 30 %). Kemudian disusul oleh perlakuan B (10% etilen glikol) dan C (20% etilen glikol) dan nilai yang terendah yaitu pada kontrol atau tanpa etilen glikol.

Hal ini menggambarkan bahwa terjadi perubahan oosit dari tahap PN-0 ke tahap PN-II pada perlakuan etilen glikol 30% sehingga mengakibatkan persentase oosit terfertilisasi nyata tertinggi dan lebih baik. Hal ini menunjukkan bahwa etilen glikol pada konsentrasi yang tepat mampu melindungi oosit pada saat pembekuan pada suhu -196°C dan dapat mempertahankan daya hidup oosit setelah thawing. Hal ini sesuai dengan fungsi etilen glikol yaitu menghindari terjadinya kristal es intraseluler, sehingga mengurangi kerusakan oosit yang terjadi akibat proses vitrifikasi (Mohammad dkk, 2005) dan mempertahankan daya hidup oosit sapi setelah proses kriopreservasi dengan metode vitrifikasi dan pencairan kembali (Gordon, 1994).

Etilen glikol efektif digunakan sebagai krioprotektan untuk kriopreservasi embrio dan diaplikasikan pula pada kriopreservasi oosit, karena memiliki berat molekul yang rendah (62,07) dan memberikan efek yang menguntungkan berupa permeabilitas yang lebih tinggi. Kendala pada saat kriopreservasi adalah krioprotektan yang memiliki toksik yang tinggi (Kasai, 1996). Namun penelitian ini menggunakan etilen glikol yang memiliki toksisitasnya yang rendah (Gordon, 1994) sehingga masalah toksik yang tinggi tidak terjadi.

Penggunaan krioprotektan etilen glikol 30 % dengan lama paparan 3 menit menunjukkan tingkat fertilitasi tertinggi dan terbaik pada pembekuan oosit sapi (Wahjuningsih dkk, 2010) ditambahkan oleh Rimayanti (2005) vitrifikasi dengan etilen glikol dengan lama waktu pemaparan 10, 20, dan 30 menit dapat mempertahankan viabilitas oosit pasca thawing sehingga metode vitrifikasi dapat digunakan sebagai metode untuk kriopreservasi oosit. Vitrifikasi ovarium mencit menggunakan krioprotektan etilen glikol 30 % mampu tumbuh setelah autotransplantasi di subkapsular ginjal. Meskipun viabilitas setelah 30 hari

transplantasi menunjukkan hasil yang rendah, akan tetapi folikel yang berhasil berkembang menunjukkan morfologi normal (kusdiantoro dkk, 2005).

Secara keseluruhan penambahan krioprotektan etilen glikol 30% pada media kriopreservasi oosit sapi Bali menghasilkan tingkat maturasi tertinggi yaitu 77,5 % dan tingkat fertilisasi 32,5 % . Jadi konsentrasi etilen glikol yang terbaik diantara perlakuan yaitu 30 %.

PENUTUP

Kesimpulan

1. Kriopreservasi oosit sapi Bali dengan penambahan krioprotektan etilen glikol dapat mengurangi penurunan presentase oosit yang matang (M-II) dan tingkat fertilisasi oosit yang dibuahi.
2. Konsentrasi terbaik krioprotektan etilen glikol yaitu 30%.

Saran

Disarankan untuk menggunakan krioprotektan etilen glikol 30% untuk meningkatkan maturasi dan fertilisasi oosit sapi Bali. Selain itu juga disarankan agar ada yang meneliti tentang penggunaan etilen glikol pada konsentrasi lebih dari 30%.

DAFTAR PUSTAKA

- Alm. H., Torner. H., Lohrke. B., Viequtz. T., Ghoneim. I. M and Kanitz. W. 2005. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose- 6 phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63 : 2194-2205
- Amann. R. P. 1999. Cryopreservation of semen. London: Academic. Vol. 1. Hlm 773-783.
- Amir. N. 2014. Fisiologi haid pada wanita. Blogspot Nadia fitriana amir. Diakses Pada Tanggal 1 Januari 2017.
- Anwar. R. 2005. Morfologi dan Fungsi Ovarium. Bandung : Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.
- Brackett.B.G and Zuelke. K.A. 1993. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. Vol. 39 : 43-63
- Campbell. N. A., Jane. B. R., Urry. L. A., Mitchell. L. C., Steven. A. W., Peter. V. M and Robert. B. J. 2010. *Biology*. Erlangga. Jakarta.
- Campbell. N. A., Reece J. B, and Mitchel L. G. 2000. *Biologi*. Erlangga. Jakarta.
- Chohan, K. R and Hunter A. G. 2003. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following in vitro maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 76 : 43-51.
- Citra. S. R. 2013. Proses oogenesis pada manusia. <http://bioedulima.blogspot.Com/2013/04/oogenesis-padamanusia>. Di akses 2 Desember 2016.
- Cox. J. F., Hormazabal. J., and Santa. M. A. 1993. Effect of cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*. 40:1259-1267
- Frandsen. R. D., Wilke. W. L dan Fails. A. D. 2003. *Anatomy of The Female Reproductive System*. Baltimore-Maryland, USA.
- Ganong. W. F. 2003. *Review of Medical Physiology*, Nineteenth edition. Apleton & Lange: Stamford Connecticut.
- Gasparrini. B. 2002. In vitro embryo production in buffalo species: State of the art. *Theriogenology*. 57:237-256.
- Gasperz. V. 1991. *Metode Rancangan Percobaan*. Bandung: Armico.
- Gazali. M dan Tambing. 2002. Kriopreservasi sel spermatozoa. *Hayati* 9 : 27-32.
- Gordon. I. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology*. 41 : 95-100.
- Gordon. I. R. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CABI Publishing; Wallingford UK.

- Gunawan, M., M. Fahrudin dan A. Boediono. 2014. Perkembangan embrio sapi setelah fertilisasi menggunakan metode *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) dan aktivasi dengan strontium. Jurnal Kedokteran Hewan Vol. 8 No. 2:1978-225.
- Hafez. B dan Hafez. E. S. E. 2000. Anatomy Of Female Reproduction. USA.
- Hammam. A. M., Whisnant. C. S., Elias. A., Zaabel. S. M., Hegab. A.O and Abu. E. N. 2010. Effect of media, sera and hormones on in vitro maturation and fertilization of water buffallos (*bubalus bubalis*). J. Anim. Vet. Adv. 9: 27-31.
- Hamny. 2006. Studi morfologi organ reproduksi kancil (*tragulus javanicus*) dengan tinjauan khusus pada ovarium, perkembangan folikel, dan pematangan oosit in vitro. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Heffner. L. J. and Schust. D. J. 2008. System reproduksi. Surabaya. Erlangga. Hal : 34-40.
- Herdis., Rizal. M., Boediono. A., Arifiantini. R. I., Saili. T., Aku. A. S dan Yulnawati. 2005. Optimasi kualitas semen beku domba garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. J Pengembangan Peternakan Tropis. 30: 229-236.
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik (peterjemah Harya putra). Penerbit ITB. Bandung.
- Jalalaluddin. M, 2014. Morfometri dan karakteristik histologi ovarium sapi aceh. (*bos indicus*) selama siklus estrus. Jurnal medika veterinaria. Universitas syiah kuala. Aceh. Vol.8 : 66-68.
- Kaiin. E. M., Said. S dan Tappa. B. 2008. Kelahiran Anak Sapi Hasil Fertilisasi secara in Vitro dengan Sperma Hasil Pemisahan. Jurnal Media Peternakan, vol. 31. 22-28.
- Kasai. M. 2002. Advances In The Cryopreservation Of Mammalian Oocytes And Embryos: Development of ultrarapid vitrification.
- Kimura. Y., Manabe. N., Nishihara. S., Matsushita. H., Tajima. C., Wada. S and Miyamoto. H. 1999. Up-Regulation of the α 2,6-sialyl transferas messenger ribonucleic acid increases glycoconjugates containing α 2,6-linked sialic acid residues in granulose cells during follicular atresia of porcine ovaries. Biol. of Repro. Vol. 60 : 1475-1482.
- Kostaman. T. S dan Setioko A. R. 2011. Tingkat penurunan suhu pada kriopreservasi primordial germ cell (pgc) dari tiga jenis ayam lokal Indonesia. J. Itv Bogor. Vol. 16 : 218-223
- Kusindarta. D. L. 2009. Pengaruh lama maturasi dan lama inkubasi fertilisasi terhadap angka fertilitas oosit sapi peranakan ongole secara in vitro. Jurnal Kedokteran Hewan Vol. 3 No. 1.

- Kusumadewi. I. 2005. Prarancangan pabrik etilen glikol dari etilen oksida dan air dengan proses hidrasi non katalitik kapasitas 110.000 ton/tahun. Hal 1-21.
- Lemma. A. 2011. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility Croatia (R): Intech.
- Lonergan. P, Rizos. D, Adan. A. G, Fair. F and Boland. M. T. 2003. Oocyte and embryo quality: affect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 59-67.
- Lopes. C. A. P, Dossantos. R. R, Celestino. J. J. D, Melo. M. A. P, Chaves. R. N, Campelo. C. C, Silva. J. R.V, Ao. S. N.B, Jewgenow. K and Firquiredo. J. R. 2009. Short-term preservation of canine pre antral follicles, effect of temperature : medium and time. *Anim. Repro. Sci.* 155 : 201-204.
- Mohammad. K., Ita. J., Arief. B and Iman. S. 2005. Vitrifikasi ovarium mencit menggunakan etilen glikol dan DMSO sebagai krioprotektan dan viabilitasnya pasca autotransplantasi di subkapsula ginjal. departemen reproduksi dan kebidanan, Institut Pertanian Bogor. Vol. 21 : 23-27.
- Mtango. N. R., Varisanga. M. D., Dong. Y. J., Rajamahendran. R and Suzuki. T. 2003. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocyst. *Theriogenology* 59: 1393-1402.
- Nandi S. Chauhan MS, Palta P. 1998. Effect of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus Bubalis*) oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*. 50:1251-1262.
- Ownby. C. 2007. Male reproductive system. <http://instruction.cvhs.okstate.edu/histology/mr/himrp2.htm>, August 3rd, 2016.
- Pamungkas. F. A. 2010. Pemanfaatan metode vitrifikasi untuk kriopreservasi oosit mamalia. *J. wartazoa*. Vol. 20 : 112-118.
- Pemayun. T. G. O. 1986. Aktivitas ovarium sapi bali yang dipotong di rumah potong hewan pesanggaran Denpasar-Bali.
- Pujol. M. M., Bejar. L and Paramio M. T. 2004. Developmental competence of heifer oocyte selected using the brilliant crecyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61 : 35-44.
- Rasby. R and Vinton. R. 2001. Theestrouscycle. <http://beef.unl.edu/learning/estrous.shtm>.
- Rimayanti. 2005. Pengaruh proses vitrifikasi dengan krioprotektan etilen glikol terhadap daya hidup oosit sapi. *J. media kedokteran hewan*. Vol. 21 : 28-31.
- Rosadi., Bayu., Mohamad. A. S., Dondin. S dan Arief. B. 2011. Preservasi ovarium dan pengaruhnya terhadap morfologi folikel domba. *Jurnal veteriner Fakultas Peternakan Universitas Jambi*. Hal. 91 - 97.

- Rustanto dan Sugiono. 1997. Lahirnya pedet tabung pertama di Indonesia. *Infovet*. Edisi 5. Pp. 24-25.
- Sagirkaya. H., Misirlioglu. M., Kaya. A., First. N. L., Parrish. J. J and Memili. E.. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 225-240.
- Shaw. J. M., Oranratnachai. A and Trounson. A.O.. 2000 . Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*. 53:59-72.
- Shen. P. C, Lee. S. N., Liu. B. T., Chub. F. H., Wang. C. H., Lin H. H and Chengc. W. T. K. 2008. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 1-12.
- Sinartani. 2011. Selamatkan sapi betina produktif. Badan Litbang Pertanian. Agroinovasi. Hal. Hal 1-3.
- Sirard. M. A and Blondin. P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim.Reprod.Sci.* 442 : 417-426
- Sobari. I., Trilaksana. G. N. B dan Ketut. I. S. 2012. Perbedaan aktivitas ovarium sapi bali kanan dan kiri serta morfologi oosit yang dikoleksi menggunakan metode slicing. *J.medicus veterinus*. Universitas Udayana. Denpasar. Vol 1 : 1-11.
- Supriatna. I, dan pasaribu. F.H. 1992. In vitro fertilization. Transfer embrio dan pembekuan embrio. Bogor : PAU IPB.
- Supriatna. I., Tuti. L.Y., Bambang. Y., Gozali. M dan Lies. P.H. 1999. Penerapan metode transfer langsung pada kriopreservasi embrio sapi perah. *J. media vet.* Vol 6 :1-5.
- Steel. R. G. D and Torrie. J. H. 1993. Prinsip dan prosedur statistika (pendekatan biomerik) penerjemah B. Sumatri. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Taylor. M. J. 2006. Biology of cell survival in the cold the basic bio preservation of tissues of organs. CRC- Taylor and Francis, Boca Raton. Florida.
- Telfer, D. J and Sharpley. R. S. 2008. *Tourisme and Development in The Development in The USA and Canada* by Routledge, 270 Madison Ave, New York.
- Toelihere. M. R. 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak. Bandung: Angkasa.
- Vanderhyden, B.C. and D.T. Amstrong. 1989. Role of the cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.* 40:720-728.
- Wahjuningsih. S., Suhartojo. H dan Sutiman. B. S. 2010. Pengaruh konsentrasi etilen glikol dan lama paparan terhadap tingkat fertilitas in vitro oosit sapi. *Jurnal Kedokteran Hewan* . *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 4 : 1- 4.

- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assesment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7:871-891.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 60 : 481-492.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media Maturasi Secara *In Vitro*

No	Nama Bahan	Volume
1	TCM-199	1800 µl
2	Serum FBS (fetal bovine serum)	200 µl
3	PMSG (pregnant mare serum gonadotropin)	20 µl
4	hCG (human chorionic gonadotropin)	20 µl
5	Gentamycin	4 µl

Lampiran 2. Komposisi Media Fertilisasi Secara *In Vitro*

No	Nama Bahan	Volume
1	Ultra pure water	50 ml
2	NaCl (natrium/sodium chloride)	0,2629 gram
3	KCL (kalium chloride)	0,0447 gram
4	NaHCO ₃ (natrium bicarbonate)	0,1050 gram
5	NaH ₂ PO ₄ (natrium dihydrogen phosphate monohydrate)	0,0030 gram
6	MgSO ₄ 7H ₂ O (magnesium sulfat-heptahydrate)	0,0061 gram
7	Sodium lactate 60% syrup	0,095 ml
8	Hepes	0,1191 gram
9	CaCl ₂ 2H ₂ O (calcium chloride_dihydrate)	0,0588 gram
10	Sodium pyruvate	0,0110 gram
11	Caffeine anhydrous	0,0194 gram
12	BSA (fatty acid free) fraksi V	0,2500 gram
13	Gentamycin	10 µl

Lampiran 3. Jumlah oosit yang dikriopreservasi dengan krioprotektan etilen glikol pada beberapa level berbeda

Ulangan	Perlakuan (Kualitas Oosit)				Jumlah
	A	B	C	D	
1	10	10	10	10	40
2	9	9	10	10	38
3	11	11	11	11	44
4	10	10	9	9	38
Total	40	40	40	40	120

**Lampiran 4. Pengaruh Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Tingkat
Maturasi dan Fertilisasi Oosit Secara *In Vitro* %**

Perlakuan	Ulangan	Tingkat Maturasi				Tingkat Fertilisasi		
		GV	GVBD	M1	M2	0 PN	1 PN	2 PN
A	1	3	0	3	3	8	1	0
	2	2	0	4	5	8	1	2
	3	2	0	3	5	7	2	1
	4	1	0	3	6	7	2	1
Total		8	0	13	19	30	6	4
Rata-rata		2	0	3.25	4.75	7.5	1.5	1
B	1	2	0	2	5	6	1	2
	2	2	0	4	5	7	1	3
	3	2	0	2	6	6	3	1
	4	2	0	2	6	6	3	1
Total		8	0	10	22	25	8	7
Rata-rata		2	0	2.5	5.5	6.25	2	1.75
C	1	1	0	3	6	6	0	4
	2	1	0	2	8	6	3	2
	3	1	0	2	6	5	1	3
	4	1	0	2	7	5	2	3
Total		4	0	9	27	22	6	12
Rata-rata		1	0	2.25	6.75	5.5	1.5	3
D	1	0	0	2	8	5	2	3
	2	1	0	2	8	4	4	3
	3	1	0	1	7	3	2	4
	4	1	0	1	8	3	4	3
Total		3	0	6	31	15	12	13
Rata-rata		0.75	0	1.5	7.75	3.75	3	3.25

Lampiran 6. Pengaruh Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Tingkat Maturasi dan Fertilisasi Oosit Secara *In Vitro* (Transformasi)

Perlakuan	Ulangan	Tingkat Maturasi				Tingkat Fertilisasi		
		GV	GV BD	M1	M2	0PN	1PN	2PN
A	1	35.24	0	35.24	35.24	70.45	19.46	0
	2	25.18	0	37.05	42.36	58.5	17.46	25.18
	3	26.56	0	33.21	45	56.79	26.56	18.44
	4	18.44	0	33.21	50.77	56.79	26.56	18.44
Total		105.42	0	138.71	173.37	242.53	90.04	62.06
Rata-rata		26.35	0	33.68	43.34	60.63	22.51	15.51
B	1	28.11	0	28.11	48.16	54.7	19.46	28.11
	2	25.18	0	37.05	42.36	52.89	17.46	31.44
	3	26.56	0	26.56	50.77	50.77	33.21	18.44
	4	26.56	0	26.56	50.77	50.77	33.21	18.44
Total		106.41	0	118.28	192.06	219.13	103.34	97.43
Rata-rata		26.60	0	29.57	48.01	54.78	25.83	24.35
C	1	18.44	0	33.21	50.77	50.77	0	39.23
	2	17.46	0	25.18	58.5	47.58	31.44	25.18
	3	19.46	0	28.11	54.7	48.16	19.46	35.24
	4	18.44	0	26.56	56.79	45	26.56	33.21
Total		73.8	0	113.06	189.51	191.51	77.46	132.86
Rata-rata		18.45	0	28.26	47.37	47.87	19.36	33.21
D	1	0	0	26.56	63.44	45	26.56	33.21
	2	17.46	0	25.18	58.5	37.05	37.05	31.44
	3	19.46	0	19.46	61.82	35.24	28.11	41.78
	4	18.44	0	18.44	63.44	39.23	33.21	33.21
Total		55.36	0	89.64	247.2	156.52	124.93	139.64
Rata-rata		13.84	0	22.41	61.8	39.13	31.23	34.91

**Lampiran 7. Pengaruh Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Tingkat
Maturasi
Fertilisasi Oosit Secara *In Vitro* %**

Perlakuan	Ulangan	Tingkat Maturasi				Tingkat Fertilisasi		
		GV	GVBD	M1	M2	0 PN	1 PN	2 PN
A	1	3	0	3	3	8	1	0
	2	2	0	4	5	8	1	2
	3	2	0	3	5	7	2	1
	4	1	0	3	6	7	2	1
Total		8	0	13	19	30	6	4
Rata-rata		2	0	3.25	4.75	7.5	1.5	1
Standar Deviasi		0.82	0.00	0.50	1.26	0.58	0.58	0.82
B	1	2	0	2	5	6	1	2
	2	2	0	4	5	7	1	3
	3	2	0	2	6	6	3	1
	4	2	0	2	6	6	3	1
Total		8	0	10	22	25	8	7
Rata-rata		2	0	2.5	5.5	6.25	2	1.75
Standar Deviasi		0.00	0.00	1.00	0.58	0.50	1.15	0.96
C	1	1	0	3	6	6	0	4
	2	1	0	2	8	6	3	2
	3	1	0	2	6	5	1	3
	4	1	0	2	7	5	2	3
Total		4	0	9	27	22	6	12
Rata-rata		1	0	2.25	6.75	5.5	1.5	3
Standar Deviasi		0.00	0.00	0.50	0.96	0.58	1.29	0.82
D	1	0	0	2	8	5	2	3
	2	1	0	2	8	4	4	3
	3	1	0	1	7	3	2	4
	4	1	0	1	8	3	4	3
Total		3	0	6	31	15	12	13
Rata-rata		0.75	0	1.5	7.75	3.75	3	3.25
Standar Deviasi		0.50	0.00	0.58	0.50	0.96	1.15	0.50

Lampiran 8. *Analysis Of Variance* (ANOVA) Pada Tingkat Maturasi Oosit

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:GV

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	469.772 ^a	3	156.591	4.620	.023
Intercept	7267.136	1	7267.136	214.419	.000
Perlakuan	469.772	3	156.591	4.620	.023
Error	406.708	12	33.892		
Total	8143.616	16			
Corrected Total	876.480	15			

a. R Squared = .536 (Adjusted R Squared = .420)

Multiple Comparisons

GV

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.2475	4.11657	.953	-9.2167	8.7217
	3	7.9050	4.11657	.079	-1.0642	16.8742
	4	12.5150 [*]	4.11657	.010	3.5458	21.4842
2	1	.2475	4.11657	.953	-8.7217	9.2167
	3	8.1525	4.11657	.071	-.8167	17.1217
	4	12.7625 [*]	4.11657	.009	3.7933	21.7317
3	1	-7.9050	4.11657	.079	-16.8742	1.0642
	2	-8.1525	4.11657	.071	-17.1217	.8167
	4	4.6100	4.11657	.285	-4.3592	13.5792
4	1	-12.5150 [*]	4.11657	.010	-21.4842	-3.5458
	2	-12.7625 [*]	4.11657	.009	-21.7317	-3.7933
	3	-4.6100	4.11657	.285	-13.5792	4.3592

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 33.892.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:MI

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	304.948 ^a	3	101.649	7.062	.005
Intercept	13207.181	1	13207.181	917.619	.000
Perlakuan	304.948	3	101.649	7.062	.005
Error	172.715	12	14.393		
Total	13684.844	16			
Corrected Total	477.662	15			

a. R Squared = .638 (Adjusted R Squared = .548)

Multiple Comparisons

M1

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	5.1075	2.68262	.081	-.7374	10.9524
	3	6.4125*	2.68262	.034	.5676	12.2574
	4	12.2675*	2.68262	.001	6.4226	18.1124
2	1	-5.1075	2.68262	.081	-10.9524	.7374
	3	1.3050	2.68262	.635	-4.5399	7.1499
	4	7.1600*	2.68262	.020	1.3151	13.0049
3	1	-6.4125*	2.68262	.034	-12.2574	-.5676
	2	-1.3050	2.68262	.635	-7.1499	4.5399
	4	5.8550*	2.68262	.050	.0101	11.6999
4	1	-12.2675*	2.68262	.001	-18.1124	-6.4226
	2	-7.1600*	2.68262	.020	-13.0049	-1.3151
	3	-5.8550*	2.68262	.050	-11.6999	-.0101

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 14.393.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: MII

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	788.074 ^a	3	262.691	14.246	.000
Intercept	43408.681	1	43408.681	2.354E3	.000
perlakuan	788.074	3	262.691	14.246	.000
Error	221.273	12	18.439		
Total	44418.028	16			
Corrected Total	1009.347	15			

Multiple Comparisons

M2

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-4.6725	3.03640	.150	-11.2882	1.9432
	3	-11.8475 [*]	3.03640	.002	-18.4632	-5.2318
	4	-18.4575 [*]	3.03640	.000	-25.0732	-11.8418
2	1	4.6725	3.03640	.150	-1.9432	11.2882
	3	-7.1750 [*]	3.03640	.036	-13.7907	-.5593
	4	-13.7850 [*]	3.03640	.001	-20.4007	-7.1693
3	1	11.8475 [*]	3.03640	.002	5.2318	18.4632
	2	7.1750 [*]	3.03640	.036	.5593	13.7907
	4	-6.6100	3.03640	.050	-13.2257	.0057
4	1	18.4575 [*]	3.03640	.000	11.8418	25.0732
	2	13.7850 [*]	3.03640	.001	7.1693	20.4007
	3	6.6100	3.03640	.050	-.0057	13.2257

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 18.439.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. R Squared = .781 (Adjusted R Squared = .726)

Lampiran 9. *Analysis Of Variance* (ANOVA) Pada Tingkat Fertilisasi Oosit

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:OPN

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	963.681 ^a	3	321.227	18.184	.000
Intercept	39969.006	1	39969.006	2.263E3	.000
Perlakuan	963.681	3	321.227	18.184	.000
Error	211.989	12	17.666		
Total	41144.676	16			
Corrected Total	1175.670	15			

a. R Squared = .820 (Adjusted R Squared = .775)

Multiple Comparisons

OPN

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	8.3500 [*]	2.97202	.016	1.8745	14.8255
	3	12.7550 [*]	2.97202	.001	6.2795	19.2305
	4	21.5025 [*]	2.97202	.000	15.0270	27.9780
2	1	-8.3500 [*]	2.97202	.016	-14.8255	-1.8745
	3	4.4050	2.97202	.164	-2.0705	10.8805
	4	13.1525 [*]	2.97202	.001	6.6770	19.6280
3	1	-12.7550 [*]	2.97202	.001	-19.2305	-6.2795
	2	-4.4050	2.97202	.164	-10.8805	2.0705
	4	8.7475 [*]	2.97202	.012	2.2720	15.2230
4	1	-21.5025 [*]	2.97202	.000	-27.9780	-15.0270
	2	-13.1525 [*]	2.97202	.001	-19.6280	-6.6770
	3	-8.7475 [*]	2.97202	.012	-15.2230	-2.2720

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 17.666.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:IPN

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	308.860 ^a	3	102.953	1.330	.311
Intercept	9789.618	1	9789.618	126.441	.000
Perlakuan	308.860	3	102.953	1.330	.311
Error	929.094	12	77.425		
Total	11027.573	16			
Corrected Total	1237.955	15			

a. R Squared = .249 (Adjusted R Squared = .062)

Multiple Comparisons

IPN

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-3.3250	6.22192	.603	-16.8814	10.2314
	3	3.1450	6.22192	.622	-10.4114	16.7014
	4	-8.7225	6.22192	.186	-22.2789	4.8339
2	1	3.3250	6.22192	.603	-10.2314	16.8814
	3	6.4700	6.22192	.319	-7.0864	20.0264
	4	-5.3975	6.22192	.403	-18.9539	8.1589
3	1	-3.1450	6.22192	.622	-16.7014	10.4114
	2	-6.4700	6.22192	.319	-20.0264	7.0864
	4	-11.8675	6.22192	.081	-25.4239	1.6889
4	1	8.7225	6.22192	.186	-4.8339	22.2789
	2	5.3975	6.22192	.403	-8.1589	18.9539
	3	11.8675	6.22192	.081	-1.6889	25.4239

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 77.425.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IIPN tingkat

fertilitas

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	965.801 ^a	3	321.934	5.897	.010
Intercept	11609.524	1	11609.524	212.653	.000
perlakuan	965.801	3	321.934	5.897	.010
Error	655.125	12	54.594		
Total	13230.450	16			
Corrected Total	1620.926	15			

a. R Squared = .596 (Adjusted R Squared = .495)

Multiple Comparisons

IIPN

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-8.5925	5.22464	.126	-19.9760	2.7910
	3	-17.7000 [*]	5.22464	.005	-29.0835	-6.3165
	4	-19.3950 [*]	5.22464	.003	-30.7785	-8.0115
2	1	8.5925	5.22464	.126	-2.7910	19.9760
	3	-9.1075	5.22464	.107	-20.4910	2.2760
	4	-10.8025	5.22464	.061	-22.1860	.5810
3	1	17.7000 [*]	5.22464	.005	6.3165	29.0835
	2	9.1075	5.22464	.107	-2.2760	20.4910
	4	-1.6950	5.22464	.751	-13.0785	9.6885
4	1	19.3950 [*]	5.22464	.003	8.0115	30.7785
	2	10.8025	5.22464	.061	-.5810	22.1860
	3	1.6950	5.22464	.751	-9.6885	13.0785

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 54.594.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

DOKUMENTASI



Pipet sedot yang dimodifikasi



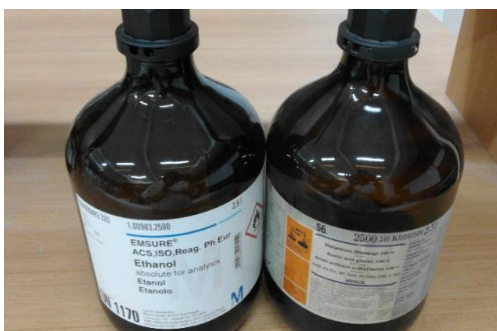
Bunsen untuk memodifikasi pipet



Mikropipet dan tip



Pipet volumetrik



Bahan untuk fiksasi



Bahan untuk pewarnaan



Tissu dan alkohol 70% untuk sterilisasi



Disk maturasi dan fertilisasi



Media transport NaCl 0.9%



Syringe filter



Mikroskop untuk pengamatan oosit



Incubator untuk maturase dan fertilisasi oosit



Memodifikasi pipet dengan bunsen



Pemotongan pipet dengan batu khusus



Pengambilan ovarium dari organ reproduksi



Pengisian nitrogen cair ke container untuk kriopreservasi



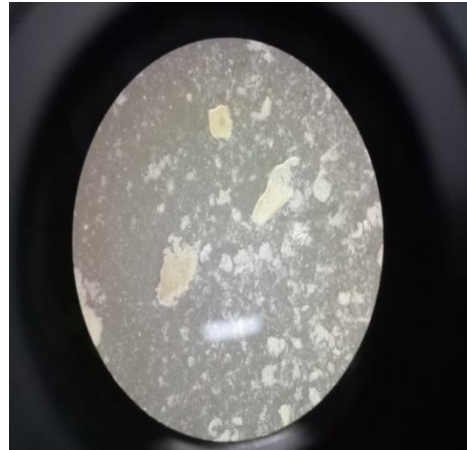
Bahan dan alat untuk pencacahan



Mencari folikel ovarium sebelum dicacah



Proses pencacahan ovarium



Proses pencacahan ovarium
dimikroskop



Pengumpulan oosit yang telah dikoleksi



Proses seleksi oosit yang telah diseleksi

RIWAYAT HIDUP



DEWI SARTIKA, Lahir di Enrekang, 24 Oktober 1994.

Anak keempat dari pasangan Dacing dan Mince, memiliki 2 kakak perempuan dan 1 kakak laki-laki serta 2 adik perempuan dan 1 adik laki-laki. penulis menyelesaikan pendidikan sekolah dasar di SDN No. 59 Garotin di Enrekang pada tahun 2007. Pada tahun yang sama penulis melanjutkan pendidikannya pada salah satu SMP di Enrekang yaitu SMP Negeri 1 Anggeraja Kabupaten Enrekang .

Kemudian pada tahun 2010 Ia melanjutkan sekolah di salah satu Sekolah Menengah Atas SMA NEG. 1 Anggeraja Kabupaten Enrekang dan lulus pada tahun 2013, Kemudian di tahun yang sama penulis diterima pada salah satu Perguruan Tinggi Negeri di Makassar yaitu pada Universitas Hasanuddin Makassar di Fakultas Peternakan.

Selama mengikuti perkuliah penulis aktif disalah satu himpunan di Fakultas Peternakan yaitu Himpunan Produksi Ternak (HIMAPROTEK) dan himpunan pelajar mahasiswa masenrenpuluh (HPMM). Penulis menyelesaikan kuliah pada tahun 2017.